

SÉRIE A, n° 338

N° D'ORDRE :

362

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

M^{ME} ROSE-IRÈNE CHEFTEL-REDEL

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA FERMENTATION CITRIQUE

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **19 MAR 1937** devant la Commission d'examen :

MM. G. BERTRAND, *Président*

R. COMBES } *Examineurs*
E. AUBEL }

Imprimerie Alençonnaise
9-13, rue des Marcheries
ALENÇON

SÉRIE A, N° 338

N° D'ORDRE :

362

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

M^{ME} ROSE-IRÈNE CHEFTEL-REDEL

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA FERMENTATION CITRIQUE

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le devant la Commission d'examen :

19 MAR 1937

MM. G. BERTRAND, *Président*

R. COMBES } *Examineurs*
E. AUBEL }

Imprimerie Alençonnaise
9-13, rue des Marcheries
ALENÇON

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire. . . . M. MOLLIARD.

Doyen. C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

Professeurs honoraires

H. LEBESGUE.	GOURSAT.	DANGEARD.
A. FERNBACH.	GUILLET.	JANET.
A. LEDUC.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
Émile PICARD.	FREUNDLER.	MARCHIS.
Rémy PERRIER.	AUGER.	VESSIOT.
Léon BRILLOUIN.	BLAISE.	P. PORTIER

PROFESSEURS

G. BERTRAND . . .	T	Chimie biologique.	L. JOLEAUD . . .	Paléontologie.
M. CAULLERY . . .	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	ROBERT-LÉVY . . .	Zoologie.
G. URBAIN	T	Chimie générale.	F. PICARD	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
Émile BOREL . . .	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	Henri VILLAT . . .	T Mécanique des fluides et applications.
Jean PERRIN . . .	T	Chimie physique.	Ch. JACOB	T Géologie.
H. ABRAHAM . . .	T	Physique.	P. PASCAL	T Chimie minérale.
E. CARTAN	T	Géométrie supérieure.	M. FRÉCHET . . .	T Calcul différentiel et calcul intégral.
M. MOLLIARD . . .	T	Physiologie végétale.	E. ESCLANGON . .	T Astronomie.
L. LAPICQUE . . .	T	Physiologie générale.	M ^{me} RAMART-LUCAS	T Chimie organique.
A. COTTON	T	Recherches physiques.	H. BÉGHIN	T Mécanique physique et expérimentale.
J. DRACH	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
Charles FABRY . .	T	Enseignement de Physique.	PAUTHENIER . . .	Physique (P. C. B.).
Charles PÉREZ . .	T	Zoologie.	De BROGLIE . . .	T Théories physiques.
Léon BERTRAND .	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	CHRÉTIEN	Optique appliquée.
E. RABAUD	T	Biologie expérimentale.	P. JOB	Chimie générale.
M. GUICHARD . . .		Chimie minérale.	LABROUSTE . . .	Physique du Globe.
Paul MONTEL . . .	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	PRENANT	Zoologie.
P. WINTREBERT .	T	Anatomie et Histologie comparées.	VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
L. BLARINGHEM .	T	Botanique.	BOHN	Zoologie (P. C. B.).
O. DUBOSCQ . . .	T	Biologie maritime.	COMBES	Botanique (P. C. B.).
G. JULIA	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	GARNIER	T Mathématiques générales
C. MAUGUIN . . .	T	Minéralogie.	PÈRES	Mécanique des fluides.
A. MICHEL-LÉVY .	T	Pétrographie.	HACKSPILL . . .	Chimie (P. C. B.).
H. BÉNARD	T	Mécanique expérimentale des fluides.	LAUGIER	Physiologie générale.
A. DENJOY	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	TOUSSAINT . . .	Technique Aéronautique.
L. LUTAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	M. CURIE	Physique (P. C. B.).
Eugène BLOCH . .	T	Physique théorique et Physique céleste.	G. RIBAUD	T Hautes températures.
G. BRUHAT		Physique.	CHAZY	T Mécanique rationnelle.
E. DARMOIS . . .		Enseignem. de Physique	GAULT	Chimie (P. C. B.).
A. DEBIERNE . . .	T	Radioactivité.	CROZE	Recherches physiques.
A. DUFOUR	T	Physique (P. C. B.).	DUPONT	T Théories chimiques.
L. DUNOYER . . .		Optique appliquée.	LANQUINE	Géologie.
A. GUILLIERMOND	T	Botanique.	VALIRON	Mathématiques générales
M. JAVILLIER . . .		Chimie biologique.	BARRABÉ	Géologie structurale et Géologie appliquée.

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire D. TOMBECK.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A MON MARI

A MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS MARTIN

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine

Hommage très respectueux.

A MONSIEUR GABRIEL BERTRAND

Professeur à la Faculté des Sciences
Chef de Service à l'Institut Pasteur
Membre de l'Institut, de l'Académie de Médecine
et de l'Académie d'Agriculture

*Témoignage de mes sentiments
très dévoués.*

TABLE DES MATIÈRES

PREMIÈRE PARTIE

I. — Introduction	1
II. — Méthodes de culture et méthodes analytiques employées.. . . .	14
a) Méthodes de culture	20
b) Méthodes analytiques :	21
1° Acidité totale, pH, sucre	22
2° Recherche qualitative de l'acide citrique et de l'acide oxalique	22
3° Dosage de l'acide citrique.	23
4° Dosage de l'acide oxalique.	32
5° Dosage du fer	36

II^e PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I ^{er} . — Rôle de la constitution des sucres dans la fermentation citrique	41
CHAPITRE II. — Essais de fermentation citrique en pré- sence de fixateurs de métaux lourds.	53
CHAPITRE III. — Essais de fermentation citrique avec une nouvelle souche de <i>Sterigmatocystis nigra</i>	74
CHAPITRE IV. — Influence du fer sur la marche de la fermentation citrique.	92
CHAPITRE V. — Résumé général	104

PREMIÈRE PARTIE

I. — INTRODUCTION

L'acide citrique est très répandu dans la nature ; on le trouve dans les fruits, dans les bulbes et dans les tubercules des plantes, en petites quantités dans le lait (1) et même dans le sang des animaux (2). Ce sont surtout les fruits de la famille des *Rutaceae* qui sont riches en acide citrique. Le suc des citrons peut contenir 7 à 9 p. 100 d'acide citrique ; les groseilles, les oranges en contiennent également des quantités appréciables. C'est à partir du suc des citrons que Scheele (3) a préparé pour la première fois, en 1784, de l'acide citrique à l'état cristallisé. Il l'a obtenu en neutralisant le suc avec de la chaux et en décomposant ensuite à l'aide d'acide sulfurique le citrate de calcium formé.

Parmi les nombreuses synthèses chimiques de l'acide citrique, rappelons la première qui a été réalisée en 1881 par E. Grimaux et P. Adam (4). C'est le glycérol dichloré symétrique qui a servi de point de

(1) T. THUNBERG, Ueber das Vorkommen einer Citrico-Dehydrogenase in Gurkensamen und ihre Verwertung für eine hochempfindliche biologische Farbenreaktion auf Citronensäure. *Biochem. Ztschr.*, 1929, **206**, 109-119.

(2) B. BENNI, B. SCHERSTÉN et O. OESTBERG, Der Zitronensäuregehalt in Blutserum des Menschen. *Biochem. Ztschr.*, 1930, **223**, 443-444.

(3) K. W. SCHEELE, Ueber die Krystallisirung der Citronensäure. *Crelles chem. Annalen*, 1784, **2**, 1-2.

(4) E. GRIMAUX et P. ADAM, Synthèse de l'acide citrique. *Bull. Soc. Chim.*, 1881 (nouvelle série), **36**, 18-22.

Dans certaines conditions, des *Aspergillus* produisent en abondance de l'acide oxalique, ce qui a induit Wehmer à affirmer l'existence de *ferments oxaliques* (10). Or, comme Currie a pu le constater, l'*Aspergillus niger* est capable de produire aussi bien de l'acide citrique que de l'acide oxalique, et cela suivant les conditions dans lesquelles on fait évoluer la moisissure.

C'est lorsqu'on cultive « la moisissure dans un milieu renfermant trois ou quatre fois plus de sucre et trois ou quatre fois moins d'azote par rapport à ce qu'elle trouve dans le liquide Raulin habituel », que « l'*Aspergillus niger* va fabriquer d'emblée de l'acide oxalique et cela en quantités massives ».

« Mais si nous allons restreindre davantage le régime alimentaire de notre moisissure, si nous allons » restreindre, « par exemple, dans sa ration minérale », la quantité de fer (*), « nous voilà devant une nouvelle métamorphose : notre moisissure devient productrice d'acide citrique » (11).

Fait de toute première importance, et contrairement à ce que Wehmer a signalé, ce n'est pas en milieu maintenu neutre par l'addition de craie que la fermentation citrique s'effectue le mieux. Ce sont, en effet, les milieux fortement acidifiés dès le début qui fournissent les rendements les meilleurs, comme cela

(10) C. WEHMER, Oxalsäure und Citronensäure-Entstehung in ihrer gegenseitigen Beziehung bei verschiedenen Rassen des Pilzes *Aspergillus niger*. Ber. chem. Ges., 1924, 57, 1659-1716.

C. WEHMER, Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze: Bot. Ztg., 1891, 49, 233-478.

(*) Mazé et Perrier (6), au cours de leur étude sur la production de l'acide citrique par les *Citromyces*, ont noté que la production d'acide citrique est favorisée également par la disette de divers éléments, comme P, K, Fe, Zn.

(11) M. SCHOEN, Problèmes actuels de la chimie des fermentations. Ann. Fermentations, 1935, 1, 257-284 et 321-347.

résulte des nombreux essais relatés par Currie. Dans ces conditions, l'*Aspergillus* se développe assez vite, mais reste pâle et ne se couvre de conidies que tardivement.

*
* *

Bien des hypothèses ont été formulées au sujet du mécanisme de la production de l'acide citrique par voie microbienne, hypothèses appuyées plus ou moins solidement sur des faits expérimentaux. Quelles que soient les divergences entre les opinions des divers auteurs qui se sont intéressés à ce problème passionnant, une idée principale semble se dégager de leurs considérations, à savoir que la production de l'acide citrique doit se trouver en relation intime avec la dégradation de la molécule de sucre par voie oxydative (*).

En effet, il y a lieu de rappeler ici que certains acides organiques ont été souvent envisagés comme des produits intermédiaires dans la formation des sucres au cours de l'assimilation chlorophyllienne. Cette idée a été exprimée à maintes reprises par Liebig (12) dans ses « Nouvelles Lettres sur la Chimie ». En se basant sur l'observation qu'au cours de la maturation des fruits les acides malique, tartrique et citrique sont transformés en sucre, Liebig avait conclu que ces acides « sont les intermédiaires de la transformation de l'acide carbonique en sucre et en combinaisons organiques plus complexes ». On peut se demander, toutefois, si l'inverse n'est pas possible; en d'autres termes, si ces acides ne prendraient pas naissance au

(*) Nous laissons ici de côté les hypothèses suivant lesquelles l'acide citrique se formerait aux dépens des protides.

(12) J. LIEBIG, Nouvelles lettres sur la chimie, t. 2, p. 2 et 3. Paris, Victor Masson, éditeur, 1852.

cours de la *dégradation* des sucres par voie oxydative.

Quelle est la marche des réactions qu'on peut envisager dans la combustion biochimique des hexoses ?

On sait que ce processus aboutit à la formation d'eau et de gaz carbonique suivant la formule bien connue :

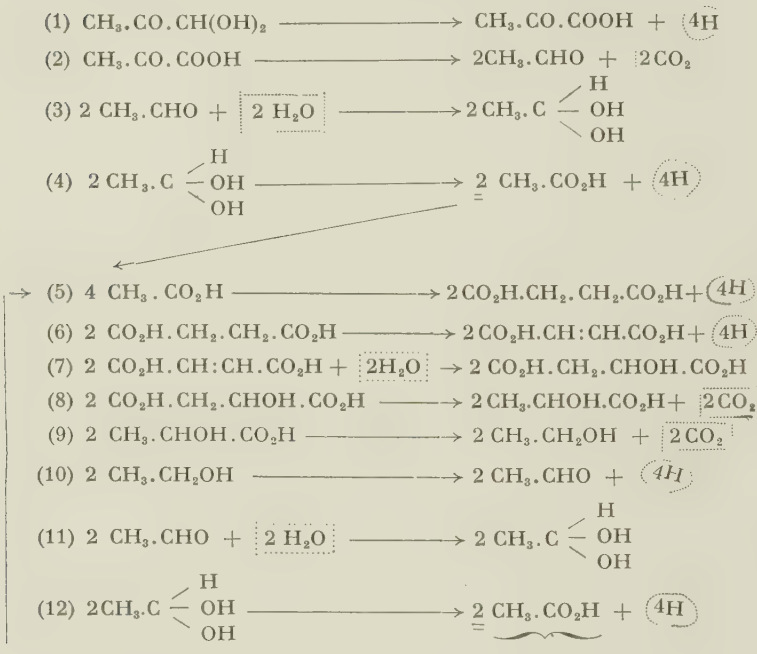


A l'heure actuelle, tout le monde semble d'accord pour admettre que la première étape de la combustion du sucre est la même, qu'il s'agisse de la respiration ou de la fermentation. Cette étape, par l'intermédiaire d'une chaîne de réactions, où l'on fait intervenir l'acide phosphorique, mène à l'acide pyruvique et à l'hydrogène, et ensuite à l'aldéhyde acétique, à l'hydrogène et au gaz carbonique, qui sont les trois produits qu'on rencontre dans tout acte fermentatif. C'est aux dépens de ces trois corps que prennent naissance aussi bien les produits finaux de toutes les fermentations que ceux de la combustion biochimique.

De ces trois corps, l'anhydride carbonique étant arrivé à la fin de sa carrière chimique, c'est sur l'aldéhyde acétique et l'hydrogène seuls que porte la combustion. Tout d'abord les deux molécules d'hydrogène libres réagiraient avec l'oxygène en formant deux molécules d'eau. L'oxydation de l'aldéhyde acétique donnerait, d'autre part, de l'acide glycolique ; ensuite, le groupement CH_2OH , le plus aisément vulnérable dans l'acide glycolique, serait attaqué par l'oxygène et transformé en COOH et donnerait de l'acide oxalique en passant par le stade d'acide glyoxalique. La dernière molécule d'oxygène disponible transformerait enfin l'acide oxalique en CO_2 et H_2O . Ces réactions sont résumées dans le schéma suivant :

savons que les *Aspergillus* sont capables d'effectuer cette transformation (14).

SCHÉMA DE THUNBERG



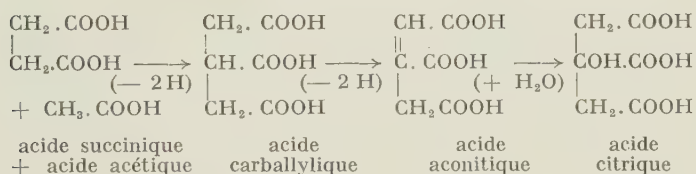
- (1) Oxydation du méthylglyoxal hydraté en acide pyruvique.
- (2) Décarboxylation de cet acide et formation d'aldéhyde acétique.
- (3) Hydratation de l'aldéhyde acétique.
- (4) Oxydation de l'hydrate d'aldéhyde acétique.
- (5) Oxydation de l'acide acétique ainsi formé en acide succinique.
- (6) Oxydation de l'acide succinique en acide fumarique.
- (7) Hydratation de la double liaison de l'acide fumarique et formation de l'acide-alcool correspondant.
- (8) Décarboxylation de ce dernier acide et formation d'acide lactique.
- (9) Décarboxylation de l'acide lactique et formation d'alcool éthylique.
- (10) Oxydation de l'alcool en aldéhyde.
- (11) Hydratation de l'aldéhyde acétique.
- (12) Oxydation de cet hydrate en acide acétique.

(14) K. BERNHAUER et L. SCHEUER, Zum Chemismus der durch *Aspergillus niger* bewirkten Säurebildungsvorgänge. *Biochem. Ztschr.*, 1932, 253, 11-15.

Une autre hypothèse, très séduisante, sur la marche de la combustion, est celle de T. Thunberg. Son schéma (v. p. 8) montre la chaîne des réactions telle que la présente E. J. Bigwood (15) dans sa revue critique sur « Le Mécanisme de la Respiration cellulaire ».

En passant de la réaction (4) à la réaction (5), le nombre des molécules d'acide acétique mis en jeu a été doublé (porté notamment de 2 à 4). Ces deux molécules supplémentaires sont celles qui proviennent de la dernière étape (12), de sorte que les opérations que comportent les étapes (5) à (12) consistent en des transformations qui se caractérisent par une réduction de 4 à 2 molécules d'acide acétique; en d'autres termes, la formation de CO_2 et de H_2O , au cours de ces étapes, correspond bien à l'oxydation complète de 2 molécules d'acide acétique, celles qui résultent notamment de la réaction (4).

La vraisemblance de ce schéma se base sur le fait que chaque réaction qui y figure est connue individuellement. L'acide citrique se formerait à partir de l'acide succinique grâce à une déshydrase mobilisant l'hydrogène de divers groupements hydrocarbonés.

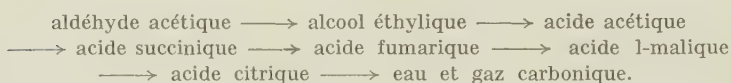


Il est à remarquer que, dans ce schéma, les oxydations résultent exclusivement de déshydrogénations; la for-

(15) E. J. Bigwood, Le mécanisme de la respiration cellulaire en aérobose et en anaérobose, p. 45, Paris, Masson et Cie, éditeurs, 1935. Voir aussi : *Ann. Fermentations*, 1935, 1, 1-32, 65-85 et 130-148.

mation de CO_2 provient de décarboxylations. L'oxygène moléculaire sert comme accepteur définitif de l'hydrogène mobilisé.

Les schémas qui viennent d'être passés en revue ne sont pas les seuls qui aient été proposés pour rendre compte du mécanisme probable de la production de l'acide citrique. Mentionnons ici l'hypothèse de T. CHRZASZCZ (16). Celle-ci consiste à faire dériver l'acide citrique par la voie suivante :



Cependant, cet auteur, dans un travail récent (17), semble abandonner cette interprétation, et ne considère plus l'acide citrique comme un produit intermédiaire, mais comme le résultat d'une condensation de l'acide glycolique.

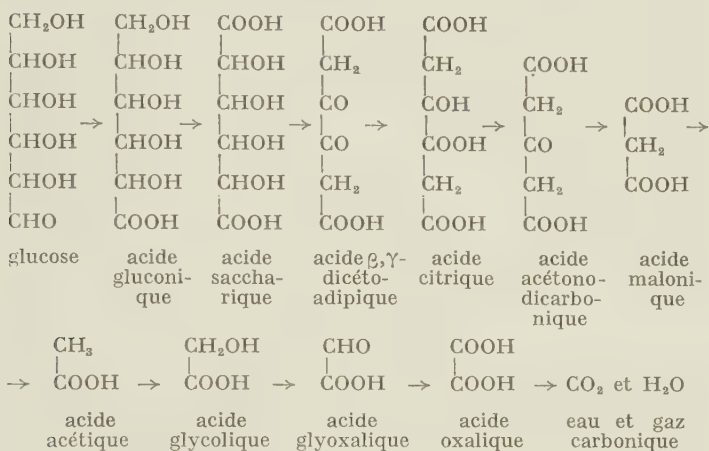
Faut-il indiquer ici à titre documentaire l'hypothèse très compliquée imaginée par Challenger, Subramaniam et Walker (18) ? Ces auteurs attribuent à l'acide citrique une position centrale dans la combustion du sucre et, pour arriver à cet acide, ils sont conduits à faire intervenir toute une série de corps intermédiaires, dont la production est peut-être probable,

(16) T. CHRZASZCZ et D. TIUKOW, Biochemische Umbildungen der Essigsäure durch Schimmelpilze und über den Chemismus der Citronensäurebildung. *Biochem. Ztschr.*, 1930, **229**, 343-357.

(17) T. CHRZASZCZ, D. TIUKOW et M. ZAKOMORNY, Ueber die biochemische Umwandlung des Aethylalkohols in Citronensäure durch Schimmelpilze. *Biochem. Ztschr.*, 1932, **250**, 254-269.

(18) F. CHALLENGER, V. SUBRAMANIAM et T. WALKER, The mechanism of the formation of citric and oxalic acids from sugars by *Aspergillus niger*. *Journ. of Chem. Soc.*, 1927, **130**, 200-208 et 3044-3054.

mais nullement prouvée par l'expérience. Voici le schéma de ces auteurs :



Dans ce schéma, l'acide citrique joue le rôle de produit intermédiaire. Cependant, le fait qu'on le trouve dans certaines cultures de *Penicillium* et d'*Aspergillus* et qu'il peut servir d'aliment aux moisissures (6) ne lui donne guère droit à ce titre. En effet, les moisissures peuvent s'attaquer aux substances les plus disparates, comme les acides lactique, tartrique et acétique, le glycérol, l'alcool éthylique, les alcools polyvalents supérieurs, etc... (16 et 19), et on admettrait difficilement que toutes ces substances puissent jouer un rôle dans le métabolisme des sucres. D'autre part, les moisissures peuvent produire à partir des substances ternaires bien d'autres acides que les acides citrique, oxalique et gluconique (20) tels que

(6) P. MAZÉ, voir p. 3.

(16) F. CHRZASZCZ et D. TIUKOW, voir p. 10.

(19) H. AMELUNG, Beiträge zur Säurebildung durch *Aspergillus niger*. Ztschr. für physiol. Chem., 1927, **166**, 161-209.

(20) M. MOLLIARD, Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatocystis nigra*. C. R. Ac. Sc., 1922, **174**, 881-883.

les acides glycuronique, adipique, kojique, fumarique, malique et succinique. Ces acides non plus ne sauraient être considérés comme produits intermédiaires (21). Il nous semble, du reste, inutile de considérer l'acide citrique comme un produit intermédiaire de la combustion du sucre. On pourrait penser plutôt à la stabilisation d'un produit intermédiaire labile, tel que l'acide glycolique sous sa forme émolique. Cette hypothèse demande à être appuyée par des données expérimentales.

*
* *

La fermentation citrique représente-t-elle une spécificité stable, permanente et héréditaire au même titre que la fermentation lactique ou la fermentation éthylique par exemple ? Le fait qu'il existe des moisissures telles que les *Citromyces* semble plaider en faveur d'une telle hypothèse. Mais lorsqu'on examine de près le mécanisme de la production microbienne de l'acide citrique, on s'aperçoit qu'il s'agit plutôt ici d'une *spécificité* qu'on peut appeler *imposée*, temporaire. En effet, l'*Aspergillus niger*, organisme carburant par excellence, devient ferment citrique, comme on vient de le dire, lorsqu'on le place dans un milieu déséquilibré, c'est-à-dire dans un milieu où les proportions relatives du sucre et de l'azote sont modifiées, et où la ration minérale est restreinte par rapport

(21) T. YABUTA, The constitution of kojic-acid, α , γ -pyrone derivative formed by *Aspergillus oryzae* from carbohydrates. *Journ. of Chem. Soc.*, 1924, **125**, 575-587.

C. WEHMER, Ueber Fumarsäure-Gärung des Zuckers. *Ber. chem. Ges.*, 1918, **51**, 1663-1668.

R. FALCK et van BEYMA thoe KINGMA, Methodisches und Prinzipielles zur Darstellung organischer Säuren auf biologischem Wege mit Hilfe von Fadenpilzen. *Ber. chem. Ges.*, 1924, **57**, 915-920.

R. FALCK, et S. N. KAPUR, Ueber Glucosäure-Bildung durch Fadenpilze. *Ber. chem. Ges.*, 1924, **57**, 920-923.

à ce que la moisissure trouve dans le liquide de Raulin. Dans ces conditions, le métabolisme glucidique de la moisissure est ralenti et des produits partiellement dégradés, stabilisés sous une forme donnée, apparaissent dans le milieu (voir à ce sujet M. Molliard, p. 14).

Mais si on lève les restrictions alimentaires et que l'on rende à la moisissure son régime habituel, elle reprend son élan naturel et brûle à nouveau intégralement la matière glucidique. C'est donc à une fermentation *déviée*, dans le sens que J.-B. Dumas (22) a donné à ce terme, qu'on assiste dans la fermentation citrique.

Il est évident que les opérations qui conduisent à la production de CO_2 et d'eau aux dépens des sucres ne se produisent pas spontanément. Ces opérations sont déclenchées à l'aide d'un système catalytique très complexe. On comprend ainsi que lorsque cet appareillage catalytique est au complet, le travail chimique est effectué, à une vitesse donnée, en entier. Mais, si l'un des constituants de ce complexe catalytique fait défaut ou se trouve en quantité insuffisante, le travail fourni par le système catalytique ainsi *estropié* reste inachevé.

C'est ainsi que la fermentation citrique apparaît comme le résultat d'une *insuffisance catalytique*, le résultat en somme d'une *asphyxie* partielle. Cette asphyxie n'est pas due à l'absence de l'oxygène bien entendu, mais à une *insuffisance respiratoire*, et les produits qui prennent naissance dans une telle fermentation, soit l'acide citrique, soit l'acide oxalique, se présentent en quelque sorte comme des produits d'une *indigestion* et le processus entier apparaît comme le résultat d'une carence imposée (13).

(22) J.-B. DUMAS, Recherches sur la fermentation alcoolique. *Ann. Chim. Phys.*, 1874 (5), 3, 57-108.

(13) M. SCHOEN, voir p. 7.

II. — MÉTHODES DE CULTURE ET MÉTHODES ANALYTIQUES EMPLOYÉES

Avant de passer à l'exposé de nos recherches personnelles, nous allons résumer brièvement les principaux travaux se rapportant à la fermentation citrique. Un certain nombre de ces travaux ont été déjà mentionnés ; nous avons réservé pour ce chapitre ceux qui ont trait aux méthodes de culture.

Parmi ces travaux, il faut citer en premier lieu ceux de M. Molliard. Cet auteur a utilisé, pour le *Sterigmatocystis nigra* (*), un milieu de culture voisin de celui de Raubin. Voici la composition de ce milieu :

Saccharose	46,6 g.
NH ₄ NO ₃	3,56 g.
KH ₂ PO ₄	0,80 g.
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,80 g.
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,046 g.
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,046 g.
Eau.	Q. S. p. 1.000 cm ³ .

Cultivée dans ce milieu, qui renferme le saccharose et les sels minéraux dans des proportions assurant le développement optimum du mycélium, la moisissure ne forme que des traces d'acide ; on se trouve donc ici en présence d'une respiration normale (voir p. 6). Si, au contraire, la dose de l'azote et des sels minéraux est ramenée au 1/10 ou au 1/25 de la dose normale, en même temps que la dose du saccharose est augmentée ou bien laissée telle quelle, on voit apparaître les acides

(*) Pendant longtemps aucune distinction n'a été faite entre les termes *Aspergillus niger* et *Sterigmatocystis nigra*, et encore à l'heure actuelle cette distinction n'est pas toujours respectée. Dans notre exposé, nous avons conservé la dénomination indiquée par chaque auteur.

citrique, oxalique ou gluconique. C'est M. Molliard qui, le premier, a mis en évidence la formation, par le *Sterigmatocystis nigra*, de ce dernier acide, à côté des acides citrique et oxalique (20). Lorsque le glucose remplace le saccharose, ces acides se forment également, mais en quantité plus réduite (23 et 24). La production de l'acide gluconique dépendrait principalement de la dose d'aliment azoté, alors que la formation des acides citrique et oxalique serait plutôt due à la diminution des substances minérales autres que l'azote (25). Ainsi, une diminution de la dose de phosphore donnerait un mélange d'acide citrique et d'acide oxalique ; une diminution de la dose de potassium provoquerait une accumulation d'acide oxalique (23), une réduction de la quantité de soufre entraînerait la formation d'un peu d'acide citrique (26). M. Molliard constate, d'autre part, que deux phénomènes bien distincts, correspondant à des conditions différentes, semblent présider à la formation de l'acide citrique et de l'acide gluconique ; en effet, la moisissure peut produire de l'acide oxalique aussi bien à partir de l'acide citrique que de l'acide gluconique, mais ne donne jamais d'acide citrique à partir de l'acide gluconique (27).

(20) M. MOLLIARD, voir p. 11.

(23) M. MOLLIARD, Manière dont se comporte le *Sterigmatocystis nigra* vis-à-vis de diverses substances sucrées dans les milieux faiblement minéralisés. *C. R. Ac. Sc.*, 1924, **178**, 161-163.

(24) M. MOLLIARD, Influence de la nature des sucres sur la formation d'acides organiques par le *Sterigmatocystis nigra* en milieu déséquilibré. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90**, 1395-1397.

(25) M. MOLLIARD, Nouvelles recherches sur la formation d'acides organiques par le *Sterigmatocystis nigra* en milieu déséquilibré. *C. R. Ac. Sc.*, 1924, **178**, 41-45.

(26) M. MOLLIARD, Retentissement de la composition minérale du milieu nutritif sur la structure du *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.* 1924, **178**, 1865-1867.

27) M. MOLLIARD, Sur les relations existant entre les divers acides organiques élaborés par le *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, 1931, **192**, 313-315.

Lorsque la moisissure est cultivée sur un milieu déséquilibré, elle produit un mycélium peu abondant, et consomme le sucre bien plus lentement que dans les conditions normales. Dans le milieu de culture, on peut remplacer le nitrate d'ammonium par le chlorure d'ammonium, sans que le développement du mycélium soit modifié (28); E. I. Fulmer, L. M. Christensen et H. Schopmeyer (29) ont constaté, d'autre part, que le chlorure d'ammonium constitue également une excellente source d'azote pour la formation d'acide. W. Butkewitsch et ses collaborateurs (30) ont repris certaines des expériences de M. Molliard que nous venons de citer, et ils les ont confirmées en partie.

Un chapitre particulièrement intéressant des recherches de M. Molliard est consacré à l'étude de l'influence du fer et du zinc sur les échanges nutritifs de la moisissure (31). Celle-ci a été cultivée, à partir des conidies, dans un milieu renfermant une dose double de saccharose et 1/25 de la dose habituelle de sels minéraux; on a supprimé tour à tour le sulfate de fer, ou le sulfate de zinc, ou ces deux sels à la fois. Dans ces conditions, la production d'acide citrique augmente; la moisissure se développe, mais le poids de son mycélium et la quantité de sucre consommé sont bien plus faibles que lorsque le fer

(28) M. MOLLIARD, Influence de certaines conditions sur la consommation comparée du glucose et du lévulose par le *Sterigmatocystis nigra* à partir du saccharose. *C. R. Ac. Sc.*, 1918, **167**, 1043-1046.

(29) E. I. FULMER, L. M. CHRISTENSEN et H. SCHOPMEYER, The effect of ammonium chloride upon the growth and production of acid by *Aspergillus niger*. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1935, **57**, 1537-1538.

(30) W. BUTKEWITSCH et A. TIMOFEEWA, Einfluss einzelner mineralischer Elemente des Nährmediums auf die Säurebildung bei *Aspergillus niger*. *Biochem. Ztschr.*, 1935, **275**, 405-415.

(31) M. MOLLIARD, Caractères physiologiques présentés par le *Sterigmatocystis nigra* en inanition de zinc et de fer. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, **189**, 417-420.

et le zinc sont présents. Ce sont là des résultats à rapprocher des observations publiées il y a longtemps par Gabriel Bertrand et par M. Javillier (32).

Depuis les recherches de Currie, la plupart des auteurs ont utilisé, dans les expériences de laboratoire, le milieu minéral indiqué par l'auteur américain. Il n'en est pas moins certain que de nombreux facteurs, autres que la composition du milieu de culture, jouent un rôle important dans la production de l'acide citrique. La souche de la moisissure est un facteur non négligeable. Des souches apparemment identiques du point de vue morphologique peuvent différer beaucoup dans leur activité biochimique, comme nous le ferons voir plus loin. Le mode d'ensemencement de la moisissure a son importance. Certains auteurs étudient la fermentation citrique à partir des conidies ; d'autres, au contraire, emploient la méthode de la double culture, suivant laquelle on procède d'abord à l'élevage du mycélium dans un premier milieu et ensuite à l'étude de la formation d'acide dans un deuxième milieu. Cette méthode présente, tout au moins lorsque la fermentation est assez rapide, un avantage évident ; elle permet d'établir un bilan de fermentation tout à fait indépendant des quantités de sucre utilisées à l'édification du corps mycélien. En revanche, elle se prête moins bien que l'ensemencement des conidies à l'étude du rôle de certaines substances présentes en quantité très faible.

Mais, c'est la méthode préconisée par A. J. Kluyver

(32) G. BERTRAND, Sur le rôle capital du manganèse dans la formation des conidies de l'*Aspergillus niger*. C. R. Ac. Sc., 1912, **154**, 381-383.

G. BERTRAND et M. JAVILLIER, Action combinée du manganèse et du zinc sur le développement et la composition minérale de l'*Aspergillus niger*. Bull. Soc. Chim., 1912 (4), **11**, 347-353.

et L. H. Perquin (33) qui paraît pleine de promesses. Les résultats contradictoires, la difficulté que l'on éprouve à reproduire exactement les expériences, les écarts entre divers termes identiques d'une même série d'essais proviendraient surtout des différences dans l'état physiologique des mycéliums. Pour obtenir des mycéliums toujours identiques, Kluyver cultive la moisissure dans un milieu aéré artificiellement et constamment agité. Dans ces conditions, le mycélium qui se forme se présente comme un amas de petites boulettes immergées dans le liquide de culture. Le mycélium ainsi obtenu sert ensuite, transporté dans un autre milieu, à l'étude de la fermentation, qui s'effectue également en solution maintenue en agitation. En opérant de cette manière, on arriverait à reproduire exactement les expériences en obtenant des résultats parfaitement concordants. Malheureusement, si Kluyver est arrivé à ces résultats avec l'*Aspergillus flavus*, il n'a pas été possible jusqu'ici de les obtenir avec l'*Aspergillus niger*.

Même dans le cas de l'ensemencement direct à l'aide de conidies, le mode de traitement que l'on fait subir à celles-ci semble exercer un certain effet sur la fermentation elle-même. Ainsi, E. Buchner et H. Wüstenfeld (34) signalent que l'on peut augmenter notablement le pouvoir acidifiant du *Citromyces* sur lequel ont porté leurs expériences, par un long séjour dans un milieu renfermant 15 à 20 p. 100 d'acide citrique, procédé que nous avons également employé.

La température à laquelle la fermentation est conduite joue à son tour un rôle important. Le pH du

(33) A. J. KLUYVER et L. H. PERQUIN, Zur Metodik der Schimmelstoffwechseluntersuchung. *Biochem. Ztschr.*, 1933, **266**, 68-81.

(34) E. BUCHNER et H. WÜSTENFELD, Ueber Citronensäuregärung durch *Citromyces*. *Biochem. Ztschr.*, 1909, **17**, 395-442.

milieu de culture a aussi une influence très notable sur la marche de la fermentation. Currie estimait aux environs de 3,4 le pH le plus favorable, mais on a constaté depuis qu'un pH initial de 2,0 convient parfaitement bien.

On sait, enfin, quelles difficultés présente la préparation d'un milieu exempt de fer, et il faut voir là un autre facteur sans doute variable d'un laboratoire à un autre, et même très difficile à contrôler dans une même série d'expériences. On peut, d'ailleurs, se demander s'il est possible d'obtenir un milieu rigoureusement exempt de fer, et si, dans un tel milieu, l'*Aspergillus niger* serait encore susceptible de se développer.

De nombreuses expériences, d'autre part, ont eu pour but principal l'étude de l'application industrielle de la fermentation citrique. Dans ce cas, on s'efforce d'atteindre, dans le temps le plus bref, une utilisation aussi bonne que possible du sucre en même temps qu'un rendement maximum en acide citrique. De telles expériences s'écartent ainsi en général de celles poursuivies en vue d'éclaircir le mécanisme de la fermentation, et ne sont pas directement comparables à ces dernières. W. P. Doelgner et S. C. Prescott (35), par exemple, signalent que le rapport entre le volume du milieu de culture et sa surface aérée joue dans ce cas un rôle des plus importants. Ce rapport doit être gardé aussi petit que possible, et c'est ainsi qu'on a été conduit à opérer sur de minces nappes de solution, et même, d'après F. J. Cahn (36), à utiliser des supports solides, comme les pulpes de betteraves, imbibées de milieu nutritif. Ce dernier est cons-

(35) W. P. DOELGNER et S. C. PRESCOTT, Citric acid fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, 1934, **26**, 1142-1149.

(36) F. J. CAHN, Citric acid fermentation on solid materials. *Ind. Eng. Chem.*, 1935, **27**, 201-204.

titué par une solution de saccharose ou de mélasse, que l'on ne stérilise pas avant l'ensemencement. La fermentation effectuée dans ces conditions dure trente-huit à cinquante heures, avec un rendement de 55 p. 100 dans le cas du saccharose, et de 15 à 25 p. 100 dans le cas de la mélasse. R. Falck, W. Schoeller et S. Michael (37) avaient, d'ailleurs, déjà utilisé des supports solides (terre d'infusoires calcinée), au cours d'études sur le pouvoir respiratoire de l'*Aspergillus niger*.

*
* *

Voici comment nous avons conduit nos recherches personnelles :

a) *Méthodes de culture*

Nos recherches personnelles ont porté sur deux souches différentes de *Sterigmatocystis nigra*, cultivées en surface sur milieu gélosé dont la composition est la suivante : 2,0 g. de NH_4NO_3 , 0,75 g. de KH_2PO_4 , 0,20 g. de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 75 g. de saccharose et 30 g. de gélose par litre. La culture s'opère à 25° ; après deux jours, il se forme un mycélium abondant qui noircit très rapidement. On effectue ainsi plusieurs repiquages successifs.

La fermentation citrique est effectuée dans des fioles coniques de 250 cm³ en verre « France », fermées avec des bouchons en coton peu serrés. On place dans chaque fiole 100 cm³ de milieu nutritif. Ce milieu a la même composition que le milieu gélosé, seule la concentration en sucre diffère ; elle est de 15 p. 100 au lieu de 7,5 p. 100. De plus, par l'addition de 1, 2 ou 3 cm³ d'HCl M/5, son pH est porté à 2,8-2,4. Ce

(37) R. FALCK, W. SCHOELLER et S. MICHAEL, Studien über die Säurebildung durch Fadenpilze. *Biochem. Ztschr.*, 1933, **262**, 280-293.

milieu de fermentation ne diffère donc de celui de Currie que par le pH plus bas : 2,8-2,4 au lieu de 3,4. On stérilise séparément la solution sucrée et la solution des sels nutritifs par chauffage à 105° pendant vingt-cinq minutes et, après le refroidissement, on les mélange aseptiquement. Puis, on ajoute l'acide.

L'ensemencement est effectué de la façon suivante : des conidies fraîchement formées sont mises en suspension dans une solution sucrée stérile ; on ajoute dans chaque fiole 10 gouttes de cette suspension. Les flacons sont placés à 25 ou 27° et les liquides fermentés sont analysés à des intervalles déterminés.

Afin d'éliminer, autant que possible, les impuretés éventuelles, nous avons pris les précautions suivantes :

1° A part quelques premières expériences effectuées avec de l'eau distillée du laboratoire, nous nous sommes servis d'eau bidistillée, obtenue dans un appareil en verre Pyrex.

2° Dans toutes nos expériences, nous avons employé les mêmes produits, toujours aussi purs que possible. Les sels nutritifs ont été recristallisés deux fois. Les sucres utilisés étaient du sucre de canne et du glucose pur pour analyse R. A. L.

3° La verrerie a été lavée à l'acide chlorhydrique chaud et rincée à l'eau bidistillée. Les flacons, dans lesquels on a effectué les fermentations, ont été échaudés à la vapeur pendant une demi-heure avant emploi.

b) *Méthodes analytiques*

Pour doser les produits formés au cours de la fermentation citrique, on opère de la manière suivante : on verse le liquide fermenté dans un ballon jaugé de 250 cm³, on lave plusieurs fois le flacon et le mycélium

avec de l'eau distillée et on ajoute les eaux de lavage au liquide fermenté. Le mycélium est desséché à 100°, jusqu'à poids constant. Le liquide fermenté et les eaux de lavage sont amenés à 250 cm³ avec de l'eau distillée et filtrés. Dans le filtrat ainsi obtenu on dose l'acidité titrable, le sucre restant et on recherche la présence des acides citrique et oxalique. Si ces acides sont présents, on les dose.

1. — ACIDITÉ TOTALE, pH, SUCRE

L'acidité titrable est déterminée dans 10 cm³ du liquide à analyser à l'aide d'une solution titrée de soude décijnormale avec la phénolphthaléine comme indicateur.

La mesure du pH est effectuée par la méthode colorimétrique.

Le sucre restant est dosé par la méthode de Gabriel Bertrand (38). Dans le cas du saccharose, un deuxième dosage effectué après l'hydrolyse avec l'HCl, a toujours donné un résultat identique à celui obtenu avant inversion, ce qui montre que la moisissure invertit complètement le saccharose après quelques jours de fermentation, même lorsqu'elle n'en consomme que très peu.

2. — RECHERCHE QUALITATIVE DE L'ACIDE CITRIQUE ET DE L'ACIDE OXALIQUE

La recherche de l'acide citrique se fait de la manière suivante : quelques centimètres cubes du liquide à examiner sont additionnés de quelques gouttes de

(38) G. BERTRAND. Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Chim.*, 1906 (3), 35, 1285-1299.

réactif de Denigès (*); on chauffe ensuite et on ajoute, par petites portions, une solution de permanganate de potassium à 5 p. 100 environ. Un trouble ou un précipité blanc indique la présence d'acide citrique.

L'acide oxalique est décelé de la manière suivante : on neutralise quelques cm^3 du liquide avec l'ammoniaque, on acidifie avec de l'acide acétique concentré en présence de rouge de méthyle comme indicateur et on ajoute à chaud quelques gouttes d'une solution de CaCl_2 à 10 p. 100. Si, après une ou deux heures, aucun précipité ne s'est formé, on peut considérer que l'acide oxalique est absent. Si, au contraire, il se forme un précipité, il y a lieu de remarquer qu'il peut être dû non seulement à de l'oxalate de calcium, mais aussi à du citrate de calcium. Toutefois, les cristaux de ce dernier se déposent plus tard que ceux de l'oxalate et ils ont une structure différente, ce qui permet de les reconnaître facilement. La présence des acides pyrophosphorique et orthophosphorique ne gêne pas la réaction, parce que les sels de calcium de ces acides sont solubles dans l'acide acétique.

3. — DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE

C'est par une combinaison des méthodes de J. J. Willaman (39) et de A. I. Kogan (40) que nous avons dosé l'acide citrique au cours de nos recher-

(*) Le réactif de Denigès est préparé en dissolvant 5 g. d'oxyde mercurique dans 20 cm^3 d'acide sulfurique concentré et en amenant ensuite à 100 cm^3 avec de l'eau distillée.

(39) J. J. WILLAMAN, Modification of the Pratt method for the determination of citric acid. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1916, **38**, 2193-2199.

(40) A. I. KOGAN, Ueber die Bestimmung der Citronensäure in Gegenwart einiger anderer organischer Substanzen. *Ztschr. für anal. Chem.*, 1930, **80**, 112-122.

ches. Voici les lignes générales de notre méthode :

La méthode de dosage de Willaman est basée sur le fait, connu depuis longtemps, que les agents oxydants en présence d'un acide minéral transforment l'acide citrique en acétone et en anhydride carbonique (41). On sépare l'acétone par distillation et on la dose en utilisant à cette fin la réaction de Denigès qui fait intervenir la formation d'un sel complexe entre l'acétone et le réactif de Denigès (*) (43). Willaman constate qu'on peut doser l'acide citrique en présence des acides suivants : malique, tartrique (en quantité inférieure à 0,5 g.), oxalique et aconitique. Le saccharose non plus ne gêne pas le dosage, à condition que l'acide citrique soit tout d'abord séparé sous la forme de citrate de baryum comme l'a proposé D. S. Pratt (44). On dissout dans l'acide chlorhydrique le complexe acétono-sulfo-mercurique isolé, et, après neutralisation, on titre par une solution d'iodure de potassium le HgCl_2 formé (45).

Willaman est obligé de déterminer expérimentalement la relation quantitative entre l'acide citrique et le KI employé, étant donné que jusqu'à présent on n'est pas parvenu à donner une formule définitive au complexe acétono-sulfo-mercurique. Nous voyons

(41) PÉAN DE SAINT-GILLES, Recherches sur les propriétés oxydantes du permanganate de potasse. *Ann. Chim. Phys.*, 1859 (3), **55**, 374-399.

(*) On peut également doser l'acétone en utilisant la réaction de Stahre (42).

(42) L. STAHRÉ, voir P. DOBRINER, *Chemische Analyse organischer Körper. Ztschr. für anal. Chem.*, 1897, **36**, 195.

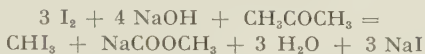
(43) G. DENIGÈS, Sur de nouvelles classes de combinaisons mercurico-organiques et sur leurs applications. *Ann. Chim. Phys.*, 1899 (7), **18**, 382-432.

(44) D. S. PRATT, Determination of citric acid. *U. S. Dept. Agr. Bur. Chem. Circular*, 88 (20 jan. 1912).

(45) M. J. PERSONNE, Mémoire sur le dosage du mercure par les volumes à l'aide de liqueurs titrées. *C. R. Ac. Sc.*, 1863, **56**, 951-954.

ainsi que la méthode de Willaman présente un grave inconvénient : l'introduction d'un facteur empirique pour le calcul du résultat.

La méthode de Kogan se base sur les données suivantes : J. Messinger (46) indiqua une méthode très simple pour le dosage de l'acétone par l'iode en milieu alcalin. Ce composé, en effet, est transformé quantitativement en iodoforme, selon l'équation :



Kogan (40) a appliqué cette méthode au dosage de l'acide citrique en présence d'autres acides organiques. L'oxydation par le KMnO_4 et la distillation font toutefois apparaître, à côté de l'acétone, l'aldéhyde acétique, peut-être même d'autres substances qui, en milieu alcalin, attaquent l'iode et faussent ainsi le dosage de l'acétone. Pour remédier à cet inconvénient, Kogan fait agir sur le distillat, en milieu sulfurique, avant le dosage de l'acétone, quelques cm^3 de permanganate à 5 p. 100. Après avoir laissé agir pendant cinq minutes, il élimine l'excès de permanganate par l'eau oxygénée et l'excès d'eau oxygénée par le MnSO_4 . Ensuite, il filtre, alcalinise et dose l'acétone. D'après les résultats de Kogan, le KMnO_4 , dans les conditions décrites, détruit l'aldéhyde acétique et les autres substances susceptibles d'agir sur l'iode, mais laisse l'acétone intacte. Kogan a effectué ainsi le dosage de l'acide citrique en présence d'acide tartrique, d'acide malique et d'acide lactique, de glycérol, de lactose et de glucose. Il dose ainsi l'acide citrique à 0,001 g. près, avec une erreur ne dépassant

(46) J. MESSINGER, voir W. FRESENIUS, *Chemische Analyse organischer Körper. Ztschr. für anal. Chem.*, 1890, **29**, 696-697.

(40) A. I. KOGAN, voir p. 23.

pas 7,1 p. 100. Il faut noter, cependant, que l'auteur obtient ces résultats en remplaçant le rapport théorique entre l'iode employé et l'acide citrique par un facteur établi expérimentalement.

La méthode employée par nous emprunte la séparation de l'acide citrique, l'oxydation et la distillation à Willaman, le dosage de l'acétone à Kogan. La méthode de dosage, ainsi obtenue, présente évidemment un inconvénient. Si, à côté de l'acide citrique, il y a d'autres acides organiques, ceux-ci risqueront d'être partiellement précipités sous la forme de sels de baryum (47), et l'aldéhyde acétique pouvant se former risquera de fausser le dosage de l'acétone. Notons, toutefois, que ni l'acide oxalique ni l'acide gluconique ne peuvent gêner le dosage. Le premier, en effet, est entièrement oxydé par le KMnO_4 , en milieu acide, en CO_2 et H_2O , le second forme avec le baryum un sel très soluble, éliminé en totalité lors de la précipitation du citrate de baryum. Cette opération élimine également toute trace de sucres. En tenant compte du caractère de nos moisissures, l'apparition d'un autre acide organique en quantité notable nous paraît peu probable. Toutefois, par mesure de précaution, dans les trois premières séries d'expériences, nous avons effectué les dosages de l'acide citrique en double, en opérant de préférence sur des prises d'essai de volume différent. Par la suite, nous n'avons fait les dosages en double que dans certains cas, la détermination de l'acidité titrable nous fournissant déjà un contrôle. Les dosages en double, ainsi que nous avons pu le constater, ne s'écartaient jamais de plus de 4 p. 100 de la valeur moyenne. D'autre part, les dosages de quantités

(47) G. JÖRGENSEN, Ueber die Bestimmung einiger organischer Pflanzensäuren. *Ztschr. Nahr.-Genussmittel*, 1907, **13**, 241-257. Ibid., 1909, **17**, 396-412.

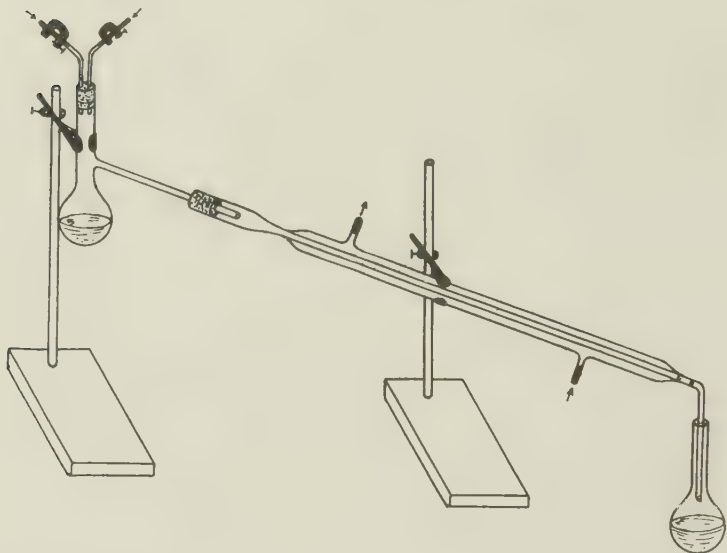
connues d'acide citrique n'ont jamais présenté une erreur supérieure à 10 p. 100, lorsqu'on a opéré sur des quantités d'acide citrique dépassant 25 mg. Nous obtenons ces résultats en nous servant de la relation théorique entre l'iode employé et l'acide citrique et sans introduire aucun facteur empirique.

Nous donnons ci-après la description détaillée de la méthode de dosage. Les prises d'essai sont neutralisées au préalable par une solution de soude, avec la phénolphthaléine ou le papier tournesol comme indicateur (*).

Ayant travaillé toujours en milieu minéral, nous n'avons pas eu à nous préoccuper de la présence éventuelle de matières pectiques. On opère sur un volume déterminé de liquide contenant, d'après l'acidité titrable, 50 à 100 mg. d'acide citrique. On ajoute de l'alcool à 96°, de manière à obtenir une liqueur contenant 30 p. 100 d'alcool en volume. Ensuite, on ajoute lentement 5 cm³ d'une solution à 10 p. 100 d'acétate de baryum dans l'alcool à 30 p. 100. On laisse déposer le citrate de baryum pendant au moins vingt-quatre heures et on le filtre sur de l'amianté dans un creuset de Gooch. On lave à trois reprises à l'alcool à 30 p. 100 et on sèche à 100°. Ensuite, on dissout à chaud le citrate de baryum dans de l'acide phosphorique à 6 p. 100, employé en trois portions de 20 cm³ chacune. On lave le filtre trois ou quatre fois à l'eau chaude et on verse

(*) Dans quelques expériences, la fermentation citrique a été effectuée en présence de craie. Dans ce cas, l'excès de craie et les autres sels insolubles de calcium sont séparés du liquide par filtration. On dose l'acide citrique dans le filtrat. On dissout, d'autre part, le précipité dans 15 à 20 cm³ d'HCl au cinquième, on amène à un volume déterminé et on dose l'acide oxalique dans le liquide ainsi obtenu. Si celui-ci contient de l'acide citrique en quantité appréciable, on dose également ce dernier. La neutralisation préalable du liquide est évidemment impossible dans ce cas, mais nous avons vérifié que dans les conditions décrites le dosage de l'acide citrique est suffisamment précis.

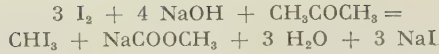
le filtrat et les eaux de lavage, ce qui donne au total environ 100 cm³ de liquide, dans un ballon à distiller de 200 cm³.



Pour régulariser l'ébullition, on met dans le ballon deux tubes capillaires assez longs et un ou deux morceaux de pierre ponce. On ferme le ballon à distiller par un bouchon en caoutchouc traversé par deux tubes effilés à l'extrémité inférieure et dépassant le bouchon d'à peine un centimètre à l'intérieur du ballon. Ces tubes sont reliés, par l'intermédiaire de tuyaux en caoutchouc, l'un à un flacon de deux litres environ contenant du KMnO_4 à 0,05 p. 100, l'autre à un flacon semblable renfermant de l'eau distillée. Des pinces de Mohr placées sur les tuyaux permettent de régler la vitesse d'écoulement des liquides. La tubulure latérale du ballon est reliée à un réfrigérant. L'extrémité du réfrigérant est munie d'un tube recourbé

qui plonge dans un ballon jaugé, de 200 cm³ par exemple, où on recueille l'acétone. On chauffe le ballon à distiller à la flamme nue et, lorsque le liquide est en ébullition, on fait arriver le KMnO_4 à la vitesse de 2 à 2,5 gouttes à la seconde. Si le volume du liquide dans le ballon devient trop petit au cours de l'opération, on ajoute de l'eau distillée. Quand la couleur rose foncé du KMnO_4 persiste après deux minutes, l'oxydation est finie. A la fin de la distillation, il ne doit rester dans le ballon que 15 à 20 cm³ de liquide. On prend soin d'arrêter le courant de KMnO_4 quelques minutes avant la fin de la distillation. Toute l'opération de distillation dure, suivant les quantités d'acide citrique employées, une demi-heure à deux heures.

L'acétone ainsi recueillie est ensuite dosée d'après la méthode de Kogan. On rince le réfrigérant deux ou trois fois avec de l'eau distillée. On ajoute dans le ballon jaugé de 200 cm³, contenant l'acétone et les eaux de lavage, 20 cm³ de soude à 10 p. 100 et on amène au trait de jauge. Dans 100 cm³ de cette solution on détermine la teneur en acétone d'après la méthode de Messinger. A cette fin on ajoute, en un mince filet et en agitant le flacon, une solution décimale d'iode, de manière à en avoir un excès d'une fois et demie au moins. On laisse agir la solution d'iode pendant cinq minutes, en agitant fréquemment. Ensuite, on acidifie avec une solution d'acide sulfurique à 25 p. 100 et on titre l'iode en excès avec une solution décimale d'hyposulfite de sodium en présence d'empois d'amidon comme indicateur. De la quantité d'iode qui a servi à l'oxydation de l'acétone, on déduit la quantité d'acide citrique.



1 cm³ de la solution d'iode N/10 qui contient $\frac{127}{10.000}$ g. d'iode

correspond à $\frac{210,1}{6 \times 10.000}$ g. = 0,0035 g. d'acide citrique.

D'après les équations, 1 cm³ d'une solution d'iode N/10 correspond à 3,5 mg. d'acide citrique cristallisé. C'est ce facteur théorique qui a servi à nos calculs, le titre de la solution d'hyposulfite de sodium ayant été préalablement déterminé à l'aide

TABLEAU I
Dosages de quantités connues d'acide citrique

	ACIDE EMPLOYÉ mg.	ACIDE TROUVÉ mg.	ERREUR DU DOSAGE mg.	ERREUR DU DOSAGE P. 100 DE L'ACIDE EMPLOYÉ	ERREUR MOYENNE DU DOSAGE P. 100 DE L'ACIDE EMPLOYÉ
Oxydation directe de l'acide citrique	80	77,3	—2,7	3,4	1,4
	100	97,0	—3,0	3,1	
	100	100,5	+0,5	0,5	
	100	100,5	+0,5	0,5	
Oxydation de l'acide citrique préalable- ment précipité comme citrate de baryum	25	22,1	—2,9	11,6	11,6
	25	22,1	—2,9	11,6	
	50	48,7	—1,3	2,6	3,5
	50	48,5	—1,5	3,0	
	50	47,6	—2,4	4,8	
	80	76,2	—3,8	4,8	3,0
	80	79,4	—0,6	0,8	
	80	77,3	—2,7	3,4	
	100	100,5	+0,5	0,5	
	160	158,8	—1,2	0,1	

d'iode bisublimé. Kogan, au contraire, a recours à un facteur empirique, 3,92, établi en effectuant des dosages sur des quantités connues d'acide citrique.

Voici les résultats de quelques dosages effectués

TABLEAU II
Dosage de l'acide citrique dans les liquides fermentés

	VOLUME DE LA PRISE D'ESSAI cm ³	ACIDE CITRIQUE TROUVÉ mg.	ERREUR DU DOSAGE P. 100 DE LA VALEUR MOYENNE
A	20 10	90,0 42,3	3,1
B	20 10	60,0 29,6	0,7
C	5 5	32,6 32,8	0,3
D	10 10	34,9 37,0	2,9
E	20 10	55,1 27,3	0,5
F	20 20	44,1 46,2	2,3
G	20 20	43,6 44,1	0,6
H	10 5	67,2 31,5	3,2
I	20 20	51,5 51,5	0
J	20 20	44,6 42,6	3,0
K	10 10	20,5 20,6	0,2
L	40 20	49,6 23,5	2,7

sur des quantités connues d'acide citrique (Tableau I). L'acide citrique employé est de l'acide cristallisé, pur Poulenc, type Congrès 1922. On le laisse pendant vingt-quatre heures dans le dessiccateur sur du CaCl₂ avant de s'en servir.

Pour vérifier les réactifs, on fait d'abord un essai à blanc. Cet essai donne zéro, donc les réactifs employés ne contiennent pas de substances capables d'influer sur les résultats.

Nous donnons également ci-dessus les résultats d'une série de dosages effectués en double dans un certain nombre de nos liquides de fermentations (Tableau II).

4. — DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE

La méthode de dosage de l'acide oxalique la plus répandue est basée sur la formation d'oxalate de calcium, très peu soluble, suivie du dosage de ce dernier par pesée ou par titration avec le KMnO_4 . Toutefois, si d'autres acides organiques sont présents, ils sont entraînés, au moins en partie, par le précipité d'oxalate de calcium ; cet inconvénient peut être évité dans certains cas en opérant à un pH compris entre 3,3 et 4,0, auquel l'oxalate de calcium est encore très peu soluble, alors que les sels de calcium des autres acides restent en solution. Il en est ainsi par exemple pour les acides lactique, succinique, adipique, malonique et lévulique. Au contraire, la séparation est impossible même dans cette zone de pH dans le cas des acides citrique, tartrique et malique. C'est seulement en répétant la précipitation que l'on arrive à se débarrasser de ceux-ci : le citrate de calcium disparaît après deux précipitations successives et le tartrate et le malate de calcium sont éliminés après trois précipitations ainsi que J. Grossfeld, E. Lindemann et M. Schnetka (48) l'ont montré, et ainsi que nous

(48) J. GROSSFELD, E. LINDEMANN et M. SCHNETKA, Beiträge zum analytischen Verhalten der Oxalsäure. *Ztschr. für anal. Chem.*, 1934, 97, 1-14.

avons pu le vérifier en opérant sur des mélanges d'acides oxalique et citrique, d'après la méthode indiquée par ces auteurs. (Tableaux IIIa et IIIb.)

TABLEAU III a

Dosages de quantités connues d'acide oxalique en présence d'acide citrique

NOMBRE DE PRÉ- CIPITA- TIONS	ACIDE OXALIQUE EMPLOYÉ mg.	ACIDE CITRIQUE EMPLOYÉ mg.	ACIDE OXALIQUE TROUVÉ mg.	ERREUR DU DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE mg.	ERREUR DU DOSAGE P. 100 DE L'ACIDE OXALIQUE
1	10	0	9,8	—0,2	2,0
2	10	0	9,3	—0,7	7,0
2	10	100	9,3	—0,7	7,0
2	10	500	8,3	—1,7	17,0
1	15	0	14,2	—0,8	5,3
2	15	0	14,2	—0,8	5,3
2	15	150	14,2	—0,8	5,3
2	15	750	13,7	—1,3	8,7
1	20	0	19,6	—0,4	2,0
2	20	0	19,1	—0,9	4,5
2	20	200	19,1	—0,9	4,5
2	20	1.000	19,1	—0,9	4,5
1	25	0	24,0	—1,0	4,0
2	25	0	24,0	—1,0	4,0
2	25	250	24,5	—0,5	2,0
2	25	1.250	24,0	—1,0	4,0

Etant donné que dans nos liquides fermentés l'acide oxalique, lorsqu'il était présent, était toujours accompagné de l'acide citrique, c'est à la méthode de J. Grossfeld et coll. que nous nous sommes adressés pour le doser. Nous rappelons ci-après le mode opératoire.

On opère sur 25 à 100 mg. d'acide oxalique en solution. Le volume ne doit pas dépasser 100 cm³. On commence par neutraliser à l'ammoniaque en présence de méthylorangé ou de rouge de méthyle ; on ajoute ensuite 22 cm³ d'une solution tampon préparée en mélangeant 120 cm³ d'acide acétique à 96 p. 100 à 100 cm³ d'une solution d'acétate

TABLEAU III b

Dosages de quantités connues d'acide oxalique en présence d'acide citrique

NOMBRE DE PRÉCIPITATIONS	ACIDE OXALIQUE EMPLOYÉ mg.	ACIDE CITRIQUE EMPLOYÉ mg.	ACIDE OXALIQUE TROUVÉ mg.	ERREUR DU DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE mg.	ERREUR DU DOSAGE P. 100 DE L'ACIDE OXALIQUE
2	15	0	14,3	—0,7	4,0
2	15	750	13,7	—1,3	8,7
2	15	750	13,9	—1,1	7,3
2	30	0	28,7	—1,3	4,3
2	30	1.500	28,5	—1,5	5,0
2	30	1.500	29,0	—1,0	3,3
2	50	0	48,1	—1,9	3,8
2	50	2.500	49,6	—0,4	0,8
2	50	2.500	48,2	—1,8	3,6

d'ammonium à 40 p. 100. On amène ensuite, si nécessaire, à un volume de 100 cm³ environ par addition d'eau distillée, on porte à l'ébullition, et, dans le liquide bouillant, on précipite l'acide oxalique par 10 cm³ d'une solution de CaCl₂ à 10 p. 100. On laisse reposer dix-huit heures au moins, on sépare le précipité et on le sèche à 105°.

Pour cette séparation, les auteurs cités plus haut

conseillent l'emploi d'un filtre en verre poreux ; après avoir essayé cette méthode, nous avons préféré toutefois nous adresser à la centrifugation, ce qui permet de réaliser une sérieuse économie de temps.

TABLEAU IV

Dosages de l'acide oxalique dans les liquides fermentés

	VOLUME DE LA PRISE D'ESSAI cm ³	ACIDE OXALIQUE TROUVÉ mg.	ERREUR DU DOSAGE P. 100 DE LA VALEUR MOYENNE
A	50 25	3,3 1,6	1,5
B	50 25	4,05 1,95	1,9
C	50 25	4,6 2,3	0
D	50 25	3,05 1,55	0,6
E	50 50	8,1 8,1	0
F	50 50	48,25 46,8	1,5
G	50 50	16,1 14,95	3,7
H	50 50	17,7 18,45	2,1
I	50 25	21,7 10,8	0,2
J	50 25	41,8 20,55	0,8

Le précipité ainsi récolté est dissous dans 20 cm³ d'une solution d'HCl à 12,5 p. 100, cette solution est ensuite neutralisée à l' NH_3 en présence de méthylorange ou de rouge de méthyle, puis additionnée de tampon acétique et de CaCl_2 comme il a été indiqué

plus haut. On obtient ainsi un deuxième précipité d'oxalate de calcium. Grossfeld et ses collaborateurs pèsent ce sel directement ; nous avons préféré le dissoudre dans l'acide sulfurique à 25 p. 100 et titrer par une solution de KMnO_4 à N/50 environ, dont le titre a été établi selon la méthode de Gabriel Bertrand (38).

Les résultats présentés dans les Tableaux IIIa et IIIb montrent que l'erreur de ce dosage ne dépasse pas 10 p. 100, lorsqu'on opère sur des quantités d'acide oxalique supérieures à 10 mg.. Dans le cas de nos liquides fermentés, les dosages de l'acide oxalique ont été effectués souvent en double et sur des prises d'essai d'un volume différent (Tableau IV). L'erreur du dosage p. 100 de la valeur moyenne n'a jamais dépassé 4.

5. — DOSAGE DU FER

Pour doser le fer, nous nous sommes adressés à la méthode de E. Lyons (49), modifiée par G. Leawell et N. R. Ellis (50). Cette méthode de dosage est basée sur la coloration rouge que prend l'acide thioglycolique en présence de fer en solution ammoniacale. Seul le fer bivalent donne cette coloration rouge en milieu alcalin, mais étant donné que l'acide thioglycolique réduit très vite les sels ferriques en sels ferreux, on peut doser de cette manière le fer total, ferreux et ferrique.

On peut ainsi doser, à l'aide d'une échelle colorimétrique appropriée, des quantités de fer comprises entre 0,0025 et 0,025 mg..

(38) G. BERTRAND, voir p. 22.

(49) E. LYONS, Thioglycolic acid as a color test for iron. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1927, **49**, 1916-1920.

(50) G. LEAWELL et N. R. ELLIS, Determination of iron (adaptation of the mercaptoacetic acid colorimetric method to milk and blood). *Ind. Eng. Chem. (anal. ed.)*, 1934, **6**, 46-47.

Avec le temps, la coloration a tendance à pâlir ; on peut la raviver en agitant le liquide à l'air, mais il vaut mieux préparer une échelle colorimétrique fraîche avant chaque dosage.

La différence entre deux termes de la gamme est de 0,005 mg. de fer ; une gamme plus serrée ne présenterait aucun avantage, la limite de sensibilité de l'œil étant atteinte. Dans ces conditions, l'erreur du dosage ne dépasse pas 0,0025 mg.. Comme pour chaque échantillon à examiner on effectue aussi un essai à blanc, la quantité de fer effectivement présente dans la prise d'essai est dosée avec une erreur maximum de $\pm$ 0,005 mg. Si la quantité de fer dépasse 0,025 mg., il est indispensable d'avoir recours à un colorimètre.

Nous avons dosé le fer dans les mycéliums desséchés des moisissures. Pour la destruction de la matière organique, les auteurs cités emploient le mélange sulfo-perchlorique d'après E. Kahane (51). Dans ses travaux plus récents, E. Kahane (52) met toutefois en garde contre les dangers de cette technique et conseille la destruction sulfo-nitro-perchlorique. Dans nos conditions de travail, l'acide nitrique présente cependant l'inconvénient d'empêcher la formation du composé rouge, probablement en oxydant l'acide thioglycolique. Nous avons pu vérifier cependant que si on prend soin de chasser l'excès d'acide nitrique avant d'ajouter l'acide thioglycolique, la destruction sulfo-nitro-perchlorique peut être employée sans inconvénient.

(51) L. LEMATTE, G. BOINOT et E. KAHANE, Dosage des minéraux contenus dans les principaux organes utilisés en opothérapie. *Journ. Pharm. et Chem.*, 1927, 5, 325-331 et 361-373.

(52) E. KAHANE, L'action de l'acide perchlorique. 2 vol. Paris Hermann et Cie, éditeurs, 1934.

MODE OPÉRATOIRE

Réactifs :

acide sulfurique, $D = 1,83$, exempt de fer, procédé Gabriel Bertrand ;
acide nitrique, $D = 1,38$, exempt de fer, procédé Gabriel Bertrand ;
acide perchlorique, $D = 1,61$, pur Poulenc, type Congrès 1922 ;
ammoniaque pure, $D = 0,92$;
acide thioglycolique B. D. H.

Le réactif thioglycolique est préparé en ajoutant 4 cm³ d'acide thioglycolique à une solution de 8 cm³ d'ammoniaque concentrée dans 50 cm³ d'eau bidistillée. Cette solution est incolore, si l'ammoniaque et l'eau bidistillée sont exemptes de fer.

La solution étalon de fer est préparée de la manière suivante : à 0,702 g. de sel de Mohr on ajoute 2,5 cm³ d'acide sulfurique concentré et on amène à 1.000 cm³. On prend 100 cm³ de cette solution, on ajoute 14,5 cm³ d'acide sulfurique concentré et 5 cm³ d'acide nitrique. On chauffe jusqu'à la formation de vapeurs blanches. On laisse refroidir et on amène à 500 cm³. 1 cm³ de cette solution correspond à 0,02 mg. de fer.

On met la substance à analyser dans un ballon de Kjeldahl de 250 cm³ en verre Pyrex ou Sibor. On ajoute 5 cm³ d'acide sulfurique concentré. On chauffe sur une petite flamme jusqu'à la désagrégation de la matière. On laisse refroidir et on ajoute ensuite goutte à goutte de l'acide nitrique concentré jusqu'à la liquéfaction de la substance à analyser. On chasse l'excès d'acide nitrique et on ajoute par petites portions, en chauffant doucement, le mélange nitro-perchlorique. Ce dernier contient deux volumes d'HClO₄ pour un volume d'HNO₃. On chauffe doucement jusqu'à la décoloration presque complète du liquide à analyser, puis jusqu'à l'apparition de vapeurs blanches d'acide sulfurique, et on laisse refroidir. On ajoute trois fois le volume d'eau bidistillée et on chauffe de nouveau jusqu'aux fumées blanches. On laisse refroidir

et on transvase le liquide et les eaux de lavage dans un ballon de 50 cm³. On ajoute un petit morceau de papier tournesol et on neutralise avec de l' NH_3 concentrée. On acidifie ensuite avec quelques gouttes d' H_2SO_4 concentré et on laisse refroidir. Puis on ajoute 1 cm³ de réactif thioglycolique, on neutralise avec quelques

TABLEAU V
Dosage du fer dans les mycéliums

POIDS DU MYCÉLIUM SEC	FER			
	TROUVÉ	TROUVÉ DANS L'ESSAI A BLANC	CALCULÉ DANS LE MYCÉLIUM	CALCULÉ DANS 1 g. DU MYCÉLIUM SEC
	g.	mg.	mg.	mg.
2,8	0,035	0,015	0,020	0,005
2,4	0,040	0,015	0,025	0,010
2,8	0,045	0,015	0,030	0,010
2,3	0,040	0,015	0,025	0,010
3,0	0,060	0,010	0,050	0,015
2,6	0,055	0,010	0,045	0,015
1,8	0,050	0,010	0,040	0,020
2,3	0,030	0,025	0,005	0
2,5	0,025	0,025	0	0
2,1	0,025	0,025	0	0
1,9	0,010	0,005	0	0
2,6	0,015	0,005	0,010	0
2,4	0,035	0,005	0,030	0,010
2,0	0,025	0,005	0,020	0,010
0,8	0,020	0,005	0,015	0,020
2,0	0,045	0,005	0,040	0,020

gouttes d' NH_3 concentrée et on ajoute un excès de 2 cm³ d'ammoniaque concentrée.

On amène à 50 cm³ avec de l'eau bidistillée et on prélève par exemple 10 cm³ de cette solution, dont on apprécie la coloration par comparaison avec une échelle colorimétrique préparée avec des quantités connues de fer. On effectue un essai à blanc parallèlement à chaque série de dosages.

Parfois, on observe dans le liquide à examiner un trouble, dû à la précipitation de phosphates dans le milieu ammoniacal. On les élimine en filtrant le liquide à travers un filtre exempt de fer.

Au cours de ces dosages, les erreurs de lecture au colorimètre entraînent une approximation allant de $\pm 0,0005$ à $\pm 0,005$ mg. par gramme de mycélium sec.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

Rôle de la constitution des sucres dans la fermentation citrique

Dans une première série d'expériences, nous nous sommes adressés, pour l'étude de la fermentation citrique, à une souche de *Sterigmatocystis nigra* appartenant à la collection de l'Institut Pasteur et cataloguée sous la désignation *AN 315* ; cette souche avait été isolée de noix de galle.

Afin de vérifier avant tout si cette moisissure était capable de produire de l'acide citrique, nous l'avons mise en présence de deux milieux nutritifs renfermant l'un du glucose, l'autre du saccharose. Si nous nous sommes adressés à ces deux sucres, c'est que certaines expériences préliminaires laissaient prévoir que le *Sterigmatocystis* se comporterait différemment suivant la nature de l'aliment ternaire.

Les résultats de cette première expérience sont résumés dans le Tableau VI ci-après.

L'inspection des chiffres consignés dans ce tableau fait voir que le *Sterigmatocystis* en question se comporte en effet d'une manière très différente suivant qu'on lui offre du glucose ou du saccharose. Avec le premier

TABLEAU VI

Fermentation, par l'AN 315, du glucose et du saccharose

Durée de la fermentation en jours . . .	4		9		10	
Sucre employé. . . .	sac-charose	glucose	sac-charose	glucose	sac-charose	glucose
Aspect du mycélium.	presque blanc	presque noir	presque noir	noir	presque blanc	noir
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³ . . .	4,7	4,4	5,1	11,3	8,4	12,3
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) . . .	31,3	29,3	34,0	75,4	56,0	82,0
Acide oxalique. . . .	traces	traces	traces	traces	néant	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ . . .	1,1	néant	0,7	néant	1,6	néant
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	23,2	0	14,7	0	19,5	0
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. (*)	19,1	1,8	15,8	1,9	30,8	3,1
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1.	15,6	0	10,7	0	23,4	0

(*) Il va de soi que dans ces dosages on a tenu compte de l'acidité initiale du milieu. Il s'agit donc ici de l'acidité totale *formée* au cours de la fermentation.

On voit que très souvent l'acidité titrable dépasse l'acidité due à la présence de l'acide citrique *dosé*. Cette divergence est certainement attribuable au fait que dans des conditions données, des acides autres que les acides citrique et oxalique — ce dernier dosé à part dans des expériences spéciales — peuvent prendre naissance. Il faut songer en particulier à l'acide gluconique. Ce problème a été réservé pour des recherches futures.

de ces sucres, il forme un mycélium très compact et fortement plissé qui se couvre rapidement de conidies. En présence de saccharose, au contraire, le mycélium est moins serré, moins plissé, et ne se couvre de conidies que très tardivement.

D'autre part, la moisissure semble consommer le glucose avec une vitesse plus grande que le saccharose ; ainsi, après dix jours, 82 p. 100 du glucose ont disparu alors que la consommation du saccharose atteint

TABLEAU VII

Fermentation, par l'AN 315, du glucose purifié

Durée de la fermentation en jours	5	11
Aspect du mycélium	presque noir	noir
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	9,3	7,3
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	62,0	48,7
Acide oxalique	traces	traces
Acide citrique	néant	néant
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1 .	3,1	2,6

seulement 56 p. 100. Cependant, dans le premier cas, il ne se forme que très peu d'acide, et l'acide citrique n'apparaît même pas ; dans le deuxième cas, au contraire, l'acidification est très notable, et est due principalement à la production d'acide citrique.

En vue d'étudier cette différence dans le comportement de la moisissure, suivant qu'elle se trouve en présence de glucose ou bien de saccharose, nous nous sommes demandé tout d'abord si le glucose n'exerçait pas une influence inhibitrice sur la production de l'acide citrique par les impuretés qu'il renferme habi-

tuellement. On sait, en effet, que le glucose « pur » du commerce présente du point de vue de la pureté bien moins de garanties que le sucre de canne cristallisé. D'autre part, il est à envisager que certains métaux lourds, même à l'état de traces, peuvent se trouver

TABLEAU VIII a
Fermentation, par l'AN 315, de divers sucres ()*

Durée de la fermentation en jours . . .	6			
Sucre employé	saccharose	glucose	fructose	fructose + glucose
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	4,4	5,3	5,0	5,1
Sucre consommé p. 100 du sucre total (7,5 %).	58,6	70,0	66,2	68,0
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³	néant	présent	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	1,5	néant	néant	néant
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	32,1	0	0	0
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1 . .	21,9	2,1	2,4	3,6
Acides citrique et oxalique exprimés en cm ³ NaOH N/1.	21,4	—	—	—

dans le glucose et influencer grandement sur la marche de la fermentation citrique.

C'est la raison pour laquelle nous avons soumis le glucose à une purification à l'aide de « Norit »(**) et,

(*) Dans ces expériences, la concentration initiale en sucre était de 7,5 p. 100 et la concentration en sels nutritifs a été diminuée en conséquence.

(**) 250 cm³ de milieu de culture ont été agités avec 1 g. de « Norit » et filtrés après un contact de douze heures.

avec le sucre ainsi préparé, nous avons répété l'expérience précédente, toutes conditions égales d'ailleurs. Les résultats de cet essai, rapportés dans le Tableau VII, montrent que cette purification n'a entraîné aucun changement dans le comportement de la moisissure.

TABLEAU VIII b
Fermentation, par l'AN 315, de divers sucres

Durée de la fermentation en jours . . .	10			
Sucre employé	saccharose	glucose	fructose	fructose + glucose
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	5,9	6,3	5,7	6,3
Sucre consommé p. 100 du sucre total (7,5 %)	78,6	84,0	75,3	84,0
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³	néant	0,131	0,125	0,177
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	1,8	néant	néant	néant
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	30,0	0	0	0
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	27,9	3,9	3,6	5,4
Acides citrique et oxalique exprimés en cm ³ NaOH N/1.	25,7	2,1	2,0	2,8

Notre moisissure ne serait-elle pas incapable congénitalement de produire de l'acide citrique à partir du glucose ? Cet acide ne se formerait-il pas dans le cas de la fermentation du saccharose aux dépens de fructose ? On sait, en effet, que la dégradation du saccharose par le *Sterigmatocystis nigra* s'effectue toujours en passant par le sucre interverti.

Pour répondre à cette question, nous avons conduit une série d'expériences, analogues aux précédentes, dans lesquelles la matière ternaïre était constituée : a) par du fructose, b) par un mélange équimoléculaire de fructose et de glucose, c) par le glucose, d) par le saccharose. Les résultats obtenus, groupés dans les

TABLEAU VIII c
Fermentation, par l'AN 315, de divers sucres

Durée de la fermentation en jours	18			
	saccharose	glucose	fructose	fructose + glucose
Sucre employé				
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	7,5	7,5	6,9	7,2
Sucre consommé p. 100 du sucre total (7,5 %)	100,0	100,0	92,0	96,0
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³	traces	0,205	0,315	0,277
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	2,1	néant	néant	néant
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . . .	28,0	0	0	0
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . . .	30,0	5,4	7,8	8,1
Acides citrique et oxalique exprimés en cm ³ NaOH N/1. . . .	30,0	3,3	5,0	4,4

Tableaux VIII a, VIII b et VIII c, nous montrent que la moisissure dégrade avec la même vitesse, à peu de chose près, les divers sucres étudiés, sauf le glucose dont la dégradation est un peu plus rapide. Mais, ce qui importe, c'est qu'elle ne produit de l'acide citrique qu'à partir du saccharose. En présence de glucose ou de fructose on constate, au contraire, une faible pro-

duction d'acide oxalique. On doit observer également qu'en présence de fructose, la moisissure forme un

TABLEAU IX

Fermentation, par l'AN 315, du saccharose et du sucre inverti

Durée de la fermentation en jours.	5			9		12
Sucre employé .	sac-charose	sucre inverti	sucre inverti	sac-charose + 5 cm ³ HCl N /10 + 5 cm ³ NaOH N /10	sucre inverti	sac-charose + 5 cm ³ HCl N /10 + 5 cm ³ NaOH N /10
Aspect du mycélium	presque noir	presque noir	noir	noir	noir	noir
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	4,5	4,7	5,5	8,5	7,2	8,2
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) .	30,0	31,3	36,7	56,7	48,0	54,7
Acide oxalique .	traces	néant	néant	présent	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	0,5	néant	néant	0,2	traces	0,3
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . .	20,0	0	0	2,7	négligeable	3,8
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. .	18,1	3,8	5,1	5,9	5,4	7,3
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. .	13,0	0	0	3,3	négligeable	4,4

mycélium qui noircit rapidement, et qui a presque le même aspect que celui obtenu en présence de glucose.

On pouvait se dire, cependant, qu'un mélange

artificiel de glucose et de fructose n'est peut-être pas identique du point de vue de la fermentation citrique, au glucose et au fructose qui se forment par hydrolyse à partir du saccharose. Pour répondre à cette objection, nous avons étudié la manière de se comporter de notre moisissure vis-à-vis du sucre inverti, obtenu d'une part par l'hydrolyse acide, d'autre part par l'hydrolyse diastasique. Si nous avons choisi ces deux modes d'hydrolyse, c'est que le glucose et le fructose obtenus par voie diastasique pourraient ne pas présenter la même structure stéréochimique que ceux provenant de l'hydrolyse acide.

Le Tableau IX résume les résultats obtenus avec le saccharose hydrolysé par l'acide chlorhydrique ; cette inversion a été effectuée en ajoutant 5 cm³ d'HCl N/10 à 50 cm³ d'une solution à 30 p. 100 de saccharose, en chauffant pendant une heure à 100°, et en neutralisant ensuite avec de la soude N/10.

Nous voyons, d'après ces résultats, que le *Sterigmato-cystis nigra* consomme le saccharose et le sucre inverti à peu près à la même vitesse. L'acide citrique ne se forme cependant que dans le premier cas. Dans les cultures en présence de sucre inverti, nous n'en avons retrouvé tout au plus que des traces, et cela dans un seul de nos flacons. On peut observer, d'autre part, que la simple addition de 5 cm³ d'HCl N/10 et de 5 cm³ de NaOH N/10 entraîne une diminution importante du rendement en acide citrique dans le témoin. Enfin, en examinant les chiffres de l'acidité titrable pour les flacons où il ne s'est formé ni acide citrique ni acide oxalique, on se rend compte que d'autres acides non identifiés ont dû prendre naissance.

Les Tableaux X_a, X_b et X_c résument les résultats obtenus avec le saccharose hydrolysé par la saccharase.

La préparation de cette diastase et l'inversion du saccharose ont été effectués comme suit : à 25 g. de levure de boulangerie on ajoute 250 cm³ d'eau de robinet ; on laisse le tout pendant la nuit, à la température du laboratoire ; on centrifuge ensuite et on obtient ainsi une solution contenant de la saccharase. A 25 cm³

TABLEAU Xa
Fermentation, par l'AN 315, du saccharose et du sucre inverti

Durée de la fermentation en jours.	5		
	saccharose	43,7 % de sucre inverti par la saccharase	saccharose + saccharase bouillie
Sucre employé.			
Aspect du mycélium . .	blanc	presque noir	presque noir
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	3,8	6,2	4,2
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) .	25,3	41,3	28,0
Acide oxalique.	traces	traces	traces
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	0,7	0,6	0,5
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . . .	18,2	9,2	13,1
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1 (*) .	15,3	11,4	12,1
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. . . .	9,9	8,1	7,9

de la solution ainsi obtenue on ajoute ensuite 75 g. de saccharose préalablement dissous dans de l'eau et deux gouttes d'acide acétique concentré ; on complète le volume à 250 cm³ avec de l'eau distillée et on abandonne pendant douze heures à 56°. En dosant dans

(*) Voir note p. 42.

cette solution les sucres réducteurs, nous avons pu constater que dans ces conditions la saccharase avait hydrolysé tout au plus 70 p. 100 du saccharose. Notre milieu de culture contenait ainsi un mélange de saccharose et de sucre inverti.

TABLEAU X b
Fermentation, par l'AN 315, du saccharose et du sucre inverti

Durée de la fermentation en jours.	8		
	saccharose	70,3 % de sucre inverti par la saccharase	saccharose + saccharase bouillie
Sucre employé.			
Aspect du mycélium . .	presque noir	presque noir	presque noir
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	7,1	9,2	6,6
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %). .	47,3	61,3	44,0
Acide oxalique.	traces	traces	traces
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	1,6	0,6	0,5
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	23,0	7,0	8,3
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . . .	29,8	13,6	11,4
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. .	23,3	9,1	7,9

Les résultats consignés dans les Tableaux Xa, Xb et Xc montrent que la moisissure a formé de l'acide citrique dans tous les essais. Si l'on compare cependant les rendements obtenus dans ce cas avec ceux des expériences témoins, effectuées soit avec du saccharose seul, soit avec du saccharose additionné de la solution de saccharase préalablement bouillie pendant quinze

minutes, on constate que la production de l'acide citrique, maxima avec le saccharose seul, subit une première diminution du fait de la présence de saccharase inactivée; le rendement en acide citrique se trouve réduit à un chiffre encore plus bas lorsque le saccha-

TABLEAU X c

Fermentation, par l'AN 315, du saccharose et du sucre inverti

Durée de la fermentation en jours . .	12	
Sucre employé	saccharose	70,3 % de sucre inverti par la saccharase
Aspect du mycélium	noir	noir
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³ .	7,9	9,1
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	53,0	60,7
Acide oxalique	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ . .	1,2	0,5
Acide citrique p. 100 du sucre consommé	15,1	5,6
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1.	23,2	12,7
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1.	17,0	7,3

rose a subi l'inversion par la diastase. D'autre part, si l'on compare les rendements en acide citrique obtenus à partir du saccharose seul avec ceux que produit le saccharose hydrolysé, on voit que la diminution du rendement correspond sensiblement, dans chacune des expériences, à la quantité de saccharose qui a été inverti; ce fait semblerait indiquer que notre moisissure est incapable de produire de l'acide citrique à

partir du sucre inverti même lorsque l'inversion est effectuée par voie biochimique.

*
* *

Pour résumer les expériences décrites dans ce premier chapitre, nous pouvons dire que la moisissure *AN 315* est capable de produire de l'acide citrique à partir du saccharose, mais qu'elle n'en forme ni à partir du glucose, ni à partir du fructose, ni à partir d'un mélange équimoléculaire de ces deux sucres.

Le fait que l'acide citrique ne se forme pas à partir du sucre inverti ne nous permet cependant pas de conclure que la moisissure soit incapable d'utiliser, à la production de cet acide, le glucose et le fructose naissants tels qu'ils existent au moment même de l'hydrolyse du saccharose par la cellule vivante de la moisissure elle-même. On pourrait rappeler à ce sujet ce que A. Fernbach et M. Schoen (53) ont constaté à propos d'une bactérie anaérobie qui donne un lévulosane à partir du saccharose, mais n'en donne ni avec le sucre inverti, ni avec le glucose seul, ni avec le fructose seul, ni avec un mélange équimoléculaire de ces deux sucres. Ces faits avaient conduit à l'époque les auteurs à parler du glucose et du fructose *naissants*. On sait actuellement que ces formes naissantes correspondent à la forme instable γ du sucre, ou, pour employer le terme moderne, à la forme furanique.

(53) A. FERNBACH et M. SCHOEN, Sur la production du lévulose par voie biochimique. *C. R. Ac. Sc.*, 1912, **155** 84-86.

CHAPITRE II

Essais de fermentation citrique en présence de fixateurs de métaux lourds

Au cours des essais résumés dans le chapitre précédent, nous avons essayé de purifier le glucose afin de le débarrasser des métaux lourds qu'il peut renfermer et qui, par leur présence, empêcheraient la production

TABLEAU XI
*Fermentation, par l'AN 315, du glucose
en présence de sulfocyanure d'ammonium*

Durée de la fermentation en jours.	7		10		16	
Concentration en NH_4SCN . . .	$\frac{\text{M}}{800}$	$\frac{\text{M}}{200}$	0	$\frac{\text{M}}{400}$	$\frac{\text{M}}{400}$	$\frac{\text{M}}{200}$
Aspect du mycélium.	blanc	blanc	noir	blanc	presque blanc	blanc
Sucre consommé en g. dans 100 cm^3	5,5	3,8	10,0	8,9	8,7	6,2
Sucre consommé p. 100 du sucre total (20 %).	27,5	19,0	50,0	44,5	43,5	31,0
Acide citrique. .	néant	néant	néant	néant	néant	néant
Acidité titrable totale en cm^3 NaOH N/1. .	3,4	3,4	1,4	3,5	3,5	3,9

de l'acide citrique. Dans les expériences qui vont suivre, nous avons essayé de fixer ces métaux par des composés chimiques appropriés. A cet effet, nous nous sommes adressés tout d'abord au sulfocyanure d'ammonium. Nous avons choisi le sel d'ammonium

plutôt que le sel de potassium pour ne pas modifier le taux de potassium dans notre milieu de culture.

L'influence du sulfocyanure d'ammonium a été étudiée avec des solutions à 20 p. 100 de glucose renfermant le sel en question aux concentrations M/800, M/400 et M/200, et amenées à pH 2,6 par

TABLEAU XII

Fermentation, par l'AN 315, du saccharose en présence de sulfocyanure d'ammonium

Durée de la fermentation en jours.	7		10		16	
Concentration en NH_4SCN . . .	M 800	M 200	0	M 400	M 400	M 200
Aspect du mycélium.	presque blanc	blanc	noir	blanc	presque blanc	blanc
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	6,3	4,7	6,8	6,7	9,8	8,8
Sucre consommé p. 100 du sucre total (20 %).	31,5	23,5	34,0	33,5	49,0	44,0
Acide citrique. .	néant	traces	présent	néant	traces	présent
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. .	4,1	3,6	12,4	3,6	2,6	3,9

addition d'acide chlorhydrique. Il y a lieu de noter, au sujet de ces expériences, que le rapport sucre azote du milieu de culture est ici 286 au lieu de 214, par suite de l'emploi de solution à 20 p. 100 au lieu de 15 p. 100 de sucre. Le Tableau XI résume les résultats obtenus.

On voit, d'après ces chiffres, que l'acide citrique ne s'est formé dans aucun des flacons renfermant

du sulfocyanure, et que même l'acidité titrable est restée très faible dans tous les essais. On doit noter également qu'en présence de sulfocyanure, aux doses indiquées, le mycélium n'a pas fructifié même après seize jours de fermentation, alors qu'il a noirci très rapidement dans les cultures témoins, fait du reste déjà signalé il y a longtemps par A. Fernbach (54).

TABLEAU XIIIa
*Fermentation, par l'AN 315, du saccharose
en présence de sulfocyanure d'ammonium*

Durée de la fermentation en jours.	4		
Concentration en NH ₄ SCN	0	$\frac{M}{1600}$	$\frac{M}{800}$
Aspect du mycélium . .	blanc	blanc	blanc
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	2,9	4,0	3,6
Sucre consommé p. 100 du sucre total (20 %).	14,5	20,0	18,0
Acide oxalique.	traces	traces	traces
Acide citrique	présent	néant	néant
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . . .	6,1	4,4	3,4

Nous avons étudié ensuite l'effet du sulfocyanure dans des conditions identiques, mais en remplaçant le glucose par le saccharose, et nous avons constaté, ainsi que le montrent les chiffres résumés dans le Tableau XII, que même en présence de ce dernier sucre, il ne se forme plus que des traces d'acide citrique, et que l'acidité titrable reste également très faible.

(54) A. FERNBACH, Influence de l'acide sulfocyanique sur la végétation de l'*Aspergillus niger*. C. R. Ac. Sc., 1902, **135**, 51-52.

TABLEAU XIII b

Fermentation, par l'AN 315, du saccharose en présence de sulfo cyanure d'ammonium

Durée de la fermentation en jours.	7		
Concentration en NH_4SCN . . .	0	$\frac{\text{M}}{1600}$	$\frac{\text{M}}{800}$
Aspect du mycélium . .	noir	presque noir	blanc
Sucre consommé en g. dans 100 cm^3	5,2	4,9	4,7
Sucre consommé p. 100 du sucre total (20 %).	26,0	24,5	23,5
Acide oxalique.	néant	traces	traces
Acide citrique	présent	traces	traces
Acidité titrable totale en cm^3 NaOH N/1. . . .	17,4	4,5	3,9

TABLEAU XIII c

Fermentation, par l'AN 315, du saccharose en présence de sulfo cyanure d'ammonium

Durée de la fermentation en jours.	10		
Concentration en NH_4SCN . . .	0	$\frac{\text{M}}{1600}$	$\frac{\text{M}}{800}$
Aspect du mycélium . .	noir	noir	presque noir
Sucre consommé en g. dans 100 cm^3	6,6	5,2	5,6
Sucre consommé p. 100 du sucre total (20 %).	33,0	26,0	28,0
Acide oxalique.	traces	traces	traces
Acide citrique	présent	traces	néant
Acidité titrable totale en cm^3 NaOH N/1. . . .	21,6	5,4	4,1

L'ensemble de ces résultats nous a conduits à nous demander si les doses de sulfocyanure employées n'étaient pas excessives, étant donné la toxicité de ce sel; hypothèse qui semblerait confirmée par le fait que même la consommation du sucre a subi, dans certains cas, une diminution considérable.

Pour éclaircir ce point, nous avons étudié, sur du saccharose, l'influence du sulfocyanure d'ammonium aux concentrations M/800 et M/1600. Les résultats de cet essai sont résumés dans les Tableaux XIII *a*, XIII *b* et XIII *c*.

On voit que la moisissure a consommé à peu près les mêmes quantités de saccharose en présence qu'en l'absence du sulfocyanure. Dans le premier cas cependant, la production d'acide citrique a été réduite à zéro, ou presque, et l'acidité titrable elle-même est restée très faible. Quant aux mycéliums, le sulfocyanure a eu pour effet d'en retarder sensiblement la fructification; toutefois, le fait qu'ils ont noirci tout de même au bout de dix jours, semblerait indiquer que le sulfocyanure n'est pas capable de fixer de manière stable les métaux lourds. On ne peut pas dire non plus que ce sel, aux concentrations étudiées, soit toxique pour la moisissure; celle-ci consomme, en effet, le saccharose à la vitesse habituelle, et seule la formation de l'acide citrique et des autres acides est supprimée.

*
* *

Ce résultat nous a conduits à essayer ensuite, en vue de fixer les métaux lourds, deux autres sels: le cyanate et le cyanure de potassium, que nous avons utilisés aux concentrations M/1000, M/2000 et M/4000. Le Tableau XIV rend compte des résultats enregistrés dans les essais effectués avec le cyanate de potassium.

TABLEAU XIV

*Fermentation, par l'AN 315, du saccharose
en présence de cyanate de potassium*

Durée de la fermentation en jours.	7		10		13	
Concentration en KCNO.	0	M 4.000	0	M 2.000	0	M 1.000
Aspect du mycélium.	blanc	blanc	presque blanc	presque blanc	presque blanc	presque noir
Poids du mycélium sec en g.	1,8	1,4	2,4	2,3	2,7	2,4
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	6,7	5,3	8,9	7,8	10,1	8,5
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) .	44,7	35,3	59,3	52,0	67,3	56,7
Acide oxalique .	présent	présent	présent	présent	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	1,4	1,3	2,5	1,6	2,4	1,2
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . .	20,4	24,5	28,2	20,5	23,8	13,5
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. .	26,4	24,1	43,9	29,1	44,4	22,9
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1 (*)	19,6	18,6	35,9	22,9	34,3	16,4

(*) Voir note p. 42.

Il résulte de ces essais que ce sel n'empêche point la moisissure de consommer le sucre, mais qu'il a provoqué une diminution de l'acide citrique formé ainsi que de l'acidité titrable, comparativement aux essais témoins.

TABLEAU XV *a*
Fermentation, par l'AN 315, du saccharose
en présence de cyanure de potassium

Durée de la fermentation en jours.	7		
Concentration en KCN .	0 (*)	$\frac{M}{4.000}$	après 3 jours $\frac{M}{2.000}$
Aspect du mycélium. .	blanc	blanc	blanc
Poids du mycélium sec en g.	1,8	0,8	1,2
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	6,7	3,4	4,5
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %). .	44,7	22,7	30,0
Acide oxalique.	présent	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	1,4	0,4	0,7
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . . .	20,4	13,2	15,4
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	26,4	11,6	15,4
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1 .	19,6	6,4	9,9

Les Tableaux XV *a*, XV *b* et XV *c* résument des expériences analogues effectuées avec le cyanure de potassium.

On voit, d'après les chiffres ci-dessus, que l'influence

(*) Les témoins de cette expérience sont les mêmes que ceux de l'expérience rapportée au Tableau XIV..

du cyanure de potassium se manifeste par un ralentissement de la consommation du sucre au début de la culture, accompagné d'un retard dans le déve-

TABLEAU XV b

*Fermentation, par l'AN 315, du saccharose
en présence de cyanure de potassium*

Durée de la fermentation en jours.	10		
Concentration en KCN.	0 (*)	M 1.000	après 3 jours M 2.000
Aspect du mycélium. .	presque blanc	presque blanc	presque blanc
Poids du mycélium sec en g.	2,4	1,6	2,3
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	8,9	5,7	7,7
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) . .	59,3	38,0	51,3
Acide oxalique.	présent	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	2,5	0,8	2,0
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	28,2	14,1	26,6
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	43,9	16,9	35,4
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. . .	35,9	11,6	29,3

loppement du mycélium. Cet effet inhibiteur du KCN disparaît cependant au bout de treize jours, et, à ce moment, les rendements en acide citrique ont

(*) Les témoins de cette expérience sont les mêmes que ceux de l'expérience rapportée au Tableau XIV.

atteint presque la même valeur que dans les essais témoins. Ce mode d'action du cyanure de potassium semble indiquer que ce sel disparaît peu à peu du

TABLEAU XV c
*Fermentation, par l'AN 315, du saccharose
en présence de cyanure de potassium*

Durée de la fermentation en jours.	13		
Concentration en KCN.	0 (*)	M 2.000	après 3 jours M 4.000
Aspect du mycélium. .	presque blanc	presque blanc	noir
Poids du mycélium sec en g.	2,7	2,1	2,5
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	10,1	8,0	8,9
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) . .	67,3	53,3	59,3
Acide oxalique.	présent	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	2,4	1,6	2,0
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . . .	23,8	20,2	22,0
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	44,4	32,9	35,4
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. . .	34,3	23,1	28,1

milieu de culture, probablement à cause de son instabilité dans les conditions de nos expériences.

Nous avons essayé également d'ajouter le cyanure de potassium au milieu de culture, non pas au moment

(*) Les témoins de cette expérience sont les mêmes que ceux de l'expérience rapportée au Tableau XIV.

même de l'ensemencement, mais trois jours plus tard, c'est-à-dire après que les mycéliums aient pris un certain développement. Les résultats de ces essais sont résumés dans les mêmes Tableaux *XV a*, *XV b* et *XV c*. On voit que dans ces conditions la moisissure a mieux supporté la présence de ce sel; la consommation du sucre et la formation de l'acide citrique ont été moins retardées que dans le cas précédent, le mycélium s'est développé plus rapidement. C'est, toutefois, en présence de saccharose seul qu'a été obtenu le meilleur rendement en acide citrique.

La série d'expériences suivante, effectuée, comme les précédentes, afin d'étudier l'influence du cyanure de potassium, a porté sur des milieux de culture où l'aliment glucidique est représenté par du glucose, et non pas par du saccharose. Le cyanure a été ajouté, aux concentrations M/1000 et M/2000, au moment de l'ensemencement; de plus, deux flacons ont reçu, cinq jours plus tard, une deuxième portion de ce sel, à une dose correspondant à une concentration M 2000. Cette deuxième addition de cyanure avait pour but de compenser l'affaiblissement progressif de l'action de ce sel que nous avons constaté dans les essais précédents. Les résultats obtenus montrent que la présence du cyanure a eu pour effet de diminuer sensiblement la consommation du glucose. La production d'acide citrique a été nulle aussi bien en présence qu'en l'absence de KCN (*). Les résultats de cette série d'essais sont consignés dans le Tableau XVI.

L'action du cyanure de potassium ne serait-elle pas plus efficace à des pH plus élevés? Pour répondre à

(*) Une faible quantité d'acide citrique (5 p. 100 du sucre consommé) a été retrouvée dans l'un des flacons ayant reçu du cyanure à deux reprises. Il y a lieu de noter cependant que nous n'avons jamais pu reproduire ce résultat.

TABLEAU XVI

*Fermentation, par l'AN 315, du glucose
en présence de cyanure de potassium*

Durée de la fermentation en jours.	7		11			
Concentration en KCN.	0	$\frac{M}{2.000}$ après 5 jours $+\frac{M}{2.000}$	0	$\frac{M}{2.000}$	$\frac{M}{1.000}$	$\frac{M}{1.000}$ après 5 jours $+\frac{M}{2.000}$
Aspect du mycélium.	blanc	blanc	presque blanc	presque blanc	presque blanc	presque blanc
Poids du mycélium sec en g.	1,8	1,0	2,4	2,3	1,8	1,8
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	5,1	2,9	8,1	7,8	5,9	5,3
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) .	38,0	19,3	54,0	52,0	39,3	35,3
Acide oxalique .	présent	présent	présent	présent	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	néant.	0,2	néant	néant	néant	néant
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . .	0	5,3	0	0	0	0
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. .	2,4	5,5	1,9	1,7	2,9	2,7
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. .	0	2,1	0	0	0	0

cette question, nous avons porté de 2,6 à 7,0 environ le pH initial du milieu de culture, en y ajoutant de la craie à saturation. La craie a été préalablement

TABLEAU XVIIa

*Fermentation, par l'AN 315, du glucose
en présence de cyanure de potassium et de craie*

Durée de la fermentation en jours	16			
pH initial.	2,6	2,6	7,0	7,0
Concentration en KCN.	0	$\frac{M}{2.000}$	0	$\frac{M}{2.000}$
Aspect du mycélium. .	noir	noir	noir	presque noir
Poids du mycélium sec en g.	2,3	2,1	2,3	0,9
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	8,7	7,4	8,9	4,0
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	58,0	49,3	59,3	26,7
Acide oxalique	traces	traces	—	—
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	néant	néant	0,4	0,1
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	0	0	4,5	2,9
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1 . . .	3,1	1,3	—	—
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1 .	0	0	5,7	1,4

mise en contact pendant trois jours avec de l'eau distillée souvent renouvelée, et a été ajoutée au milieu de culture sous la forme d'une suspension stérilisée par chauffage à 120° pendant quarante minutes. Ces expériences ont porté sur le milieu renfermant du

glucose. Nous avons étudié comparativement la manière d'agir de la moisissure à pH 2,6 et à pH 7,0, aussi bien en présence qu'en l'absence de cyanure de potassium. Ce sel a été utilisé à la concentration M /2000.

TABLEAU XVII *b*

Fermentation, par l'AN 315, du glucose en présence de cyanure de potassium et de craie

Durée de la fermentation en jours.	19		45
pH initial	2,6	2,6	7,0
Concentration en KCN.	0	$\frac{M}{2.000}$	$\frac{M}{2.000}$
Aspect du mycélium.	noir	presque noir	presque noir
Poids du mycélium sec en g. . .	—	—	2,5
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	—	—	12,4
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %)	—	—	82,7
Acide oxalique	traces	traces	—
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ .	néant	néant	0,5
Acide citrique p. 100 du sucre consommé	0	0	3,7
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1.	1,9	1,7	—
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1.	0	0	7,1

Ces expériences sont résumées dans les Tableaux XVII *a* et XVII *b*.

Ces résultats nous permettent de constater, avant tout, ce fait nouveau que la moisissure produit de l'acide citrique à partir du glucose lorsque la craie est présente. Après seize jours, le rendement en acide

citrique peut atteindre 4,5 p. 100 du sucre consommé.

C'est pour la première fois que nous assistons à la production par notre moisissure de l'acide citrique aux dépens du glucose.

TABLEAU XVIII *a*

*Fermentation, par l'AN 315, du glucose
en présence de cyanure de potassium et de craie*

Durée de la fermentation en jours	11		15	
pH initial.	2,6	2,6	7,0	7,0
Concentration en KCN	0	$\frac{M}{2.000}$	0	$\frac{M}{2.000}$
Aspect du mycélium .	presque blanc	blanc	noir	presque noir
Poids du mycélium sec en g.	2,4	2,2	1,5	1,0
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	8,6	6,8	5,8	5,1
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	57,3	45,3	38,7	34,0
Acide oxalique	traces	traces	traces	traces
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	néant	néant	0,3	0,2
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	0	0	5,3	3,3
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	2,4	2,9	—	—
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1.	0	0	4,3	2,9

Deux autres séries d'expériences (Tableaux XVIII *a*, XVIII *b*, XIX *a* et XIX *b*), semblables à la précédente, effectuées d'une part avec le glucose habituel, d'autre part avec le glucose « Dextrosol » (produit obtenu indus-

TABLEAU XVIII b

Fermentation, par l'AN 315, du glucose en présence de cyanure de potassium et de craie

Durée de la fermentation en jours	19		22	
pH initial.	2,6	2,6	7,0	7,0
Concentration en KCN.	0	$\frac{M}{2.000}$	0	$\frac{M}{2.000}$
Aspect du mycélium. .	presque blanc	presque blanc	noir	noir
Poids du mycélium sec en g.	2,9	3,0	3,2	3,8
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	13,1	13,2	14,5	14,3
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	87,3	88,0	96,7	95,3
Acide oxalique	présent	présent	néant	néant
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	néant	néant	0,2	0,3
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	0	0	1,4	2,0
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	4,1	9,6	—	—
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1 .	0	0	2,9	4,3

TABLEAU XIX a

*Fermentation, par l'AN 315, du « Dextrosol »
en présence de cyanure de potassium et de craie*

Durée de la fermentation en jours	11		15	
pH initial	2,6	2,6	7,0	7,0
Concentration en KCN.	0	$\frac{M}{2.000}$	0	$\frac{M}{2.000}$
Aspect du mycélium. .	noir	presque noir	presque noir	presque noir
Poids du mycélium sec en g.	2,1	1,5	0,5	1,6
Sucres consommés en g. dans 100 cm ³	7,5	4,7	4,7	6,0
Sucres consommés p. 100 du sucre total (15 %)	50,0	31,3	31,3	40,0
Acide oxalique	présent	traces	traces	traces
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	néant	néant	0,1	0,2
Acide citrique p. 100 du sucre total	0	0	1,2	3,8
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	2,4	3,5	—	—
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. .	0	0	1,4	2,9

triellement à partir du maïs), confirment les résultats des Tableaux XVII *a* et XVII *b*. On voit que l'apparition de l'acide citrique dans ces expériences n'est pas due à la présence du cyanure mais résulte du changement de la réaction du milieu.

Les résultats obtenus(*) aussi bien avec le sulfocyanure

TABLEAU XIX *b*

Fermentation, par l'AN 315, du «Dextrosol» en présence de cyanure de potassium et de craie

Durée de la fermentation en jours	19		22	
pH initial.	2,6	2,6	7,0	7,0
Concentration en KCN.	0	$\frac{M}{2.000}$	0	$\frac{M}{2.000}$
Aspect du mycélium. .	noir	noir	noir	noir
Poids du mycélium sec en g.	2,4	2,6	1,1	2,7
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	10,7	10,2	6,4	9,2
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	71,3	68,0	42,7	61,3
Acide oxalique	traces	présent	traces	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	néant	néant	0,3	0,4
Acide citrique p. 100 du sucre total	0	0	4,9	4,7
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . . .	2,4	5,1	—	—
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1.	0	0	4,3	5,7

(*) Nous avons effectué également une série d'expériences, analogues à celles que nous venons de décrire, avec le milieu renfermant du saccharose. Cependant, la moisissure a montré une force acidogène si minime dans les essais témoins, que nous ne croyons pas pouvoir tenir compte des résultats obtenus. Tout au plus pouvons-nous remarquer que l'effet du KCN et de la craie a été tout à fait négligeable.

d'ammonium qu'avec le cyanate et le cyanure de potassium, se sont révélés peu encourageants. Aussi avons-nous songé à nous adresser à l'acide pyrophosphorique, capable, on le sait, de fixer le fer, comme

TABLEAU XX a

*Fermentation, par l'AN 315, du « Dextrosol »
en présence d'acide pyrophosphorique*

Durée de la fermentation en jours.	8				
pH initial	2,6	2,6	2,4	2,2	2,1
H ₄ P ₂ O ₇ M/5 ajouté, en cm ³	0	2	4	6	8
Aspect du mycélium . .	blanc	blanc	presque blanc	blanc	blanc
Poids du mycélium sec en g.	1,3	1,5	2,5	2,2	2,2
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	4,0	4,9	10,7	7,1	6,9
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) . .	26,7	32,7	71,3	47,3	46,0
Acide oxalique	traces	—	—	—	—
Acide citrique en g. dans dans 100 cm ³	néant	néant	0,2	0,1	0,2
Acide citrique p. 100 du sucre consommé	0	0	1,6	1,5	3,5
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1.	2,6	3,5	15,8	4,4	7,5
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1.	0	0	2,9	1,4	2,9

d'autres métaux lourds, sous la forme de composés complexes. Les résultats obtenus dans ces essais sont résumés dans les Tableaux XX a et XX b.

On voit, d'après les chiffres qui précèdent, que la

présence de l'acide pyrophosphorique favorise la consommation du glucose par la moisissure et, fait très important, permet à celle-ci d'agir comme « ferment citrique ».

TABLEAU XX b

Fermentation, par l'AN 315, du « Dextrosol » en présence d'acide pyrophosphorique

Durée de la fermentation en jours.	13				
pH initial	2,6	2,6	2,4	2,2	2,1
H ₄ P ₂ O ₇ M/5 ajouté, en cm ³	0	2	4	6	8
Aspect du mycélium . .	presque blanc	presque blanc	presque blanc	presque blanc	presque blanc
Poids du mycélium sec en g.	1,8	2,3	2,5	2,3	2,1
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	6,7	10,4	11,2	9,6	8,1
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) . .	44,7	69,3	74,7	64,0	54,0
Acide oxalique	traces	—	—	—	—
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	traces	0,2	0,3	0,6	0,4
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . . .	négligeable	2,3	3,0	6,3	4,9
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . . .	1,9	10,7	14,7	13,1	10,0
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. . . .	négligeable	2,9	4,3	8,6	5,7

La quantité d'acide formé est très faible dans les flacons n'ayant reçu que 2 cm³ d'H₄P₂O₇ M/5, mais augmente, en règle générale, en fonction de la dose de l'acide ajouté.

Ainsi, dans toutes les expériences décrites ci-dessus

et effectuées avec la moisissure *AN 315*, la formation de l'acide citrique, à partir du glucose, n'a pu être obtenue que dans deux cas : en présence de craie et en présence d'acide pyrophosphorique.

Dans le premier cas, nous avons changé la marche de la dégradation du sucre à la suite d'une modification du pH, phénomène à rapprocher des cas, fréquents dans la chimie des fermentations, où le changement de la réaction s'est révélé comme un facteur capable de modifier profondément une spécificité biochimique (*).

Dans le deuxième cas, nous avons forcé la moisissure à former de l'acide citrique grâce à l'addition d'un composé capable de capter les métaux lourds. Au contraire, le NH_4SCN , le KCNO et le KCN , quoiqu'ils forment également des composés peu solubles avec ces métaux, se sont montrés incapables de faire apparaître la fermentation citrique dans les conditions de nos expériences.

Il y a lieu de rappeler, à ce propos, que le KCN et le $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ jouent un rôle très important dans l'oxydation des sucres *in vitro*. Warburg et Yabusoe (55) ayant constaté que le fructose est oxydé lorsque le pH dépasse 7, dans une solution riche en phosphates, Meyerhof et Matsuoka (56) ont montré que cette oxydation était due à une catalyse métallique. En effet, le KCN et le pyrophosphate de sodium, qui forment des complexes avec les métaux lourds, gênent cette réaction, tandis que certains métaux tels que Cu, Fe et Mn la favorisent.

(55) O. WARBURG et M. YABUSOE, Ueber die Oxydation von Fructose in Phosphatlösungen. *Biochem. Ztschr.*, 1924, **146**, 380-386.

(56) O. MEYERHOF et K. MATSUOKA, Ueber den Mechanismus der Fructoseoxydation in Phosphatlösungen. *Biochem. Ztschr.*, 1924, **150**, 1-11.

(*) Voir à ce sujet M. SCHOEN, *Le problème des fermentations*, p. 148, Paris, Masson et C^{ie} éditeurs, 1926.

Le rôle de la catalyse par les métaux a été constaté également dans d'autres phénomènes d'oxydation. Ainsi Warburg et Brefeld (57) ont montré que l'oxydation des acides aminés à la surface du noir animal est liée à la présence de fer. Warburg et Sakuma (58) ont prouvé d'autre part que l'auto-oxydation de la cystéine est également due à la présence de traces de fer. Kharasch et coll. (59) en étudiant l'oxydation de l'acide thioglycolique, ont constaté que le Cu, le Fe et le Mn la favorisent, tandis que les acides ortho-meta- et pyrophosphoriques ont un effet inhibiteur.

On doit noter, au sujet de l'action du KCN, que l'empoisonnement des catalyses métalliques que provoque ce sel n'est pas irréversible. Ainsi, Meyerhof et Matsuoka (56) ont constaté que l'action du KCN sur l'oxydation du fructose dépend du pH du milieu et diminue avec l'augmentation de l'acidité.

(57) O. WARBURG et W. BREFELD, Ueber die Aktivierung stickstoffhaltiger Kohlen durch Eisen. *Biochem. Ztschr.*, 1924, **145**, 461-480.

(58) S. SAKUMA, Ueber die sogenannte Autoxydation des Cysteins. *Biochem. Ztschr.*, 1923, **142**, 68-78.

(59) M. S. KHARASCH, R. R. LEGAULT, A. B. WILDER et R. W. GERARD, Metal catalysts in biologic oxidations. *Journ. of biol. Chem.*, 1936, **113**, 537-571.

CHAPITRE III

Essais de fermentation citrique avec une nouvelle souche de *Sterigmatocystis nigra*

Les expériences précédentes ayant montré que le *Sterigmatocystis nigra* AN 315 n'était capable de former de l'acide citrique en quantités appréciables à partir

TABLEAU XXI
Fermentation du saccharose par l'AN 315 et l'AN (H₂)

Durée de la fermentation en jours	12		16	
	AN 315	AN (H ₂)	AN 315	AN (H ₂)
Souche employée . . .	AN 315	AN (H ₂)	AN 315	AN (H ₂)
Aspect du mycélium. .	blanc	blanc	blanc	blanc
Poids du mycélium sec en g.	2,2	1,8	2,6	2,7
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	8,1	11,0	9,6	14,9
Sucre consommé p. 100 du sucre total (20 %)	40,5	55,0	48,0	74,5
Acide oxalique	traces	néant	néant	néant
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	0,5	4,0	0,7	6,0
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	6,4	36,7	7,0	40,5
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	10,4	61,9	13,9	99,9
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1.	7,1	57,1	10,0	85,7

du glucose qu'en présence d'acide pyrophosphorique, nous avons tenu à vérifier si une autre souche de *Sterigmatocystis* se comportait de la même manière. A cette

fin nous nous sommes adressés à un *Sterigmatocystis nigra*, morphologiquement très voisin du précédent, provenant également des collections de l'Institut Pasteur, où il figure sous la désignation *AN(H₂)*. Cette moisissure a été trouvée sur des figues. Isolé à

TABLEAU XXIIa

Fermentation, par l'AN 315, du saccharose et du glucose

Durée de la fermentation en jours	13		19	
	saccharose	glucose	saccharose	glucose
Sucre employé	noir	noir	noir	noir
Aspect du mycélium. .	noir	noir	noir	noir
Poids du mycélium sec en g.	1,3	2,5	2,8	2,7
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	4,7	7,9	9,6	10,1
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %)	31,3	52,7	64,0	67,3
Acide oxalique	traces	traces	présent	néant
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	0,5	néant	0,5	néant
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	11,6	0	4,8	0
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1 . .	10,1	1,1	11,9	1,4
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1.	7,1	0	7,1	0

l'état pur, cet organisme a été ensuite accoutumé à l'acide citrique par de longs passages sur un milieu renfermant 10 p. 100 de cet acide.

Dans une première série d'expériences, nous avons simplement comparé cette nouvelle souche avec la

précédente, sur un milieu à 20 p. 100 de saccharose. Les résultats de cet essai figurent dans le Tableau XXI.

Les chiffres consignés dans ce tableau montrent que l'*AN* (H_2), non seulement dégrade le saccharose plus

TABLEAU XXII *b*

Fermentation, par AN (H_2), du saccharose et du glucose

Durée de la fermentation en jours	14		20	
Sucre employé	saccharose	glucose	saccharose	glucose
Aspect du mycélium. .	blanc	noir	presque blanc	presque noir
Poids du mycélium sec en g.	2,0	3,0	4,1	3,5
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	11,0	11,7	13,9	14,2
Sucre consommé p.100 du sucre total (15 %) .	73,3	78,0	92,7	94,7
Acide oxalique	présent	présent	néant	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	6,2	1,7	3,2	1,8
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	56,1	14,2	23,0	12,7
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . . .	101,0	32,4	50,6	35,7
Acide citrique exprimé en cm ³ Na OH N/1.	88,6	24,3	45,7	25,7

rapidement que l'*AN* 315, mais donne aussi un meilleur rendement en acide citrique.

Nous avons ensuite répété ces essais comparatifs sur le milieu glucosé; les Tableaux XXII *a* et XXII *b* résument cette expérience.

Les résultats consignés dans les Tableaux XXII *a* et XXII *b* montrent que l'AN (H_2), à l'opposé de l'AN 315, est capable de produire de l'acide citrique

TABLEAU XXIII *a*

*Fermentation, par l'AN (H_2), du glucose
en présence d'acide pyrophosphorique*

Durée de la fermentation en jours	10			
pH initial	2,6	2,4	2,2	1,9
H ₄ P ₂ O ₇ M/5 ajouté, en cm ³	0	4	6	10
Aspect du mycélium .	presque noir	presque blanc	presque blanc	blanc
Poids du mycélium sec en g.	2,4	2,9	2,4	2,3
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	8,9	11,0	10,0	9,5
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	59,3	73,3	66,7	63,3
Acide oxalique	présent	présent	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	1,3	5,1	3,7	4,7
Acide citrique p. 100 du sucre total	14,4	46,8	37,1	49,6
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1 (*).	22,4	87,2	77,9	82,7
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1..	18,6	72,9	52,9	67,1

à partir du glucose, quoique avec un rendement inférieur à celui que l'on obtient dans le cas du saccharose.

Ayant ainsi constaté une différence importante

(*) Voir p. 42.

entre nos deux souches de *Sterigmatocystis*, nous avons été conduits à examiner comment agirait l'AN (H_2) sur du glucose en présence d'acide pyrophosphorique.

TABLEAU XXIII b

Fermentation, par l'AN(H_2), du glucose en présence d'acide pyrophosphorique

Durée de la fermentation en jours	17			
	2,6	2,4	2,2	1,9
pH initial.	2,6	2,4	2,2	1,9
$H_4P_2O_7$ M/5 ajouté, en cm^3	0	4	6	10
Aspect du mycélium. .	presque noir	presque blanc	presque blanc	presque blanc
Poids du mycélium sec en g.	2,6	2,8	2,9	2,9
Sucre consommé en g. dans 100 cm^3	10,1	14,2	14,5	13,7
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	67,3	94,7	96,7	91,3
Acide oxalique	présent	présent	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm^3	1,5	5,7	7,1	7,4
Acide citrique p. 100 du sucre total	14,9	40,3	49,1	53,9
Acidité titrable totale en cm^3 NaOH N/1 (*)	32,1	107,2	121,9	126,4
Acide citrique exprimé en cm^3 NaOH N/1 .	21,4	81,4	101,4	105,7

Dans un premier essai le milieu de culture renfermait la dose habituelle d'azote, et le rapport sucre/azote était ainsi égal à 214 (Tableaux XXIII a et XXIII b);

(*) Voir p. 42.

dans un deuxième essai nous avons réduit de moitié la dose de l'azote (Tableaux XXIV *a* et XXIV *b*).

Il résulte des expériences qui viennent d'être

TABLEAU XXIV *a*

*Fermentation, par l'AN (H₂), du glucose
en présence d'acide pyrophosphorique*

Durée de la fermentation en jours	10			
pH initial	2,6	2,4	2,2	1,9
H ₄ P ₂ O ₇ M /5 ajouté, en cm ³	0	4	6	10
Aspect du mycélium. .	noir	presque noir	presque blanc	presque blanc
Poids du mycélium sec en g.	1,4	1,5	1,5	1,4
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	4,5	5,6	6,9	5,9
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	30,0	37,3	46,0	39,3
Acide oxalique	présent	présent	traces	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	0,7	1,9	3,3	2,6
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	14,8	34,6	48,4	43,6
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	14,4	32,7	58,7	48,4
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1..	10,0	27,1	47,1	37,1

résumées que la présence de l'acide pyrophosphorique élève notablement, dans un cas comme dans l'autre, le rendement en acide citrique ; c'est la dose la plus forte d'acide pyrophosphorique qui semble donner le meilleur résultat. Il y a lieu de noter, d'autre part,

que la diminution de la dose d'azote entraîne un ralentissement de la consommation du sucre. Le rendement en acide citrique, rapporté au sucre consommé, est toutefois le même dans les deux cas, aussi bien

TABLEAU XXIV b

Fermentation, par l'AN (H₂), du glucose en présence d'acide pyrophosphorique

Durée de la fermentation en jours	17			
pH initial.	2,6	2,4	2,2	1,9
H ₄ P ₂ O ₇ M/5 ajouté, en cm ³	0	4	6	10
Aspect du mycélium. .	presque noir	presque noir	presque blanc	presque blanc
Poids du mycélium sec en g.	1,8	1,9	2,0	1,9
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	6,1	8,4	10,2	9,7
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	40,7	56,0	68,0	64,7
Acide oxalique	présent	présent	traces	traces
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	1,0	3,8	5,2	5,3
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	16,4	45,6	51,3	54,6
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	20,6	65,7	87,9	89,9
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1 .	14,3	54,3	74,3	75,7

dans les flacons témoins que dans ceux qui contiennent de l'acide pyrophosphorique.

Dans les expériences qui suivent nous nous sommes arrêtés à la dose d'acide pyrophosphorique qui s'était

révélée la plus favorable dans l'essai précédent, c'est-à-dire 10 cm^3 d' $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ M/5 pour 100 cm^3 de milieu de culture (*).

Nous avons tenu tout d'abord à vérifier à nouveau, au cours d'une même série d'expériences, qui ont porté aussi bien sur l'*AN* 315 que sur l'*AN* (H_2), l'effet du milieu glucosé additionné d'acide pyrophosphorique en le comparant non seulement au milieu glucosé simple mais aussi au milieu renfermant du saccharose. Les résultats de ces essais sont résumés dans les Tableaux XXV *a* et XXV *b* et ils confirment entièrement les résultats obtenus jusqu'ici.

* * *

L'acide orthophosphorique n'exercerait-il pas une action semblable à celle de l'acide pyrophosphorique dont on connaît l'instabilité en milieu aqueux ? En outre, l'effet favorable de cet acide ne serait-il pas imputable tout simplement à l'acidification du milieu qu'entraîne son addition ? C'est pourquoi, pour répondre à ces questions, nous avons effectué une série d'expériences en remplaçant l'acide pyrophosphorique, soit par de l'acide orthophosphorique, soit par de l'acide chlorhydrique, en quantité équivalente (**),

(*) Nous avons jugé inutile d'étendre nos expériences à des doses d'acide pyrophosphorique encore plus grandes, car les effets obtenus avec 6 cm^3 de la solution d'acide pyrophosphorique étaient déjà très voisins de ceux obtenus avec 10 cm^3 .

(**) Dans le premier des essais effectués dans cette voie nous avons constaté que nos cultures ont pris un aspect anormal. Nous avons pu rapporter cet état des cultures à une contamination accidentelle de notre eau distillée par du permanganate de potassium. Il est intéressant de noter que dans ces conditions nos moisissures, tout en formant un mycélium velouté et noir, continuent à produire de l'acide citrique, bien qu'irrégulièrement et parfois en quantité très faible. A partir de ce moment, nous avons utilisé pour nos expériences exclusivement de l'eau bidistillée, pour laquelle nous avons vérifié l'absence de fer et de manganèse ; ce dernier a été recherché par transformation en MnO_4^- par action du persulfate en milieu nitrique avec Ag^+ comme catalyseur.

TABLEAU XXV a

*Fermentation, par l'AN 315, du glucose et du saccharose
en l'absence et en présence d'acide pyrophosphorique*

Durée de la fermentation en jours.	13			19		
	saccharose	glucose	glucose	saccharose	glucose	glucose
Sucre employé. .						
H ₄ P ₂ O ₇ M/5 ajoutée, en cm ³ .	0 (*)	0 (*)	10	0 (*)	0 (*)	10
Aspect du mycélium.	noir	noir	presque blanc	noir	noir	presque noir
Poids du mycélium sec en g.	1,3	2,5	2,8	2,8	2,7	2,8
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	4,7	7,9	7,9	9,6	10,1	10,6
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) .	31,3	52,7	52,7	64,0	67,3	70,7
Acide oxalique .	traces	traces	présent	présent	néant	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	0,5	néant	1,3	0,5	néant	1,1
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . .	11,6	0	16,6	4,8	0	9,9
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. .	10,1	1,1	24,8	11,9	1,4	27,1
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. .	7,1	0	18,6	7,1	0	15,7

(*) Les témoins de cette expérience sont les mêmes que ceux de l'expérience rapportée au Tableau XXII a.

TABLEAU XXV b

Fermentation, par l'AN (H₂), du glucose et du saccharose en l'absence et en présence d'acide pyrophosphorique

Durée de la fermentation en jours.	14			20		
Sucre employé .	saccharose	glucose	glucose	saccharose	glucose	glucose
H ₄ P ₂ O ₇ M/5 ajouté, en cm ³ .	0 (*)	0 (*)	10	0 (*)	0 (*)	10
Aspect du mycélium.	blanc	noir	blanc	presque blanc	presque noir	presque blanc
Poids du mycélium sec en g.	2,0	3,0	2,8	4,1	3,5	3,3
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	11,0	11,7	10,9	13,9	14,2	13,4
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) .	73,3	78,0	72,7	92,7	94,7	89,3
Acide oxalique .	présent	présent	présent	néant	présent	présent
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	6,2	1,7	3,4	3,2	1,8	4,5
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . .	56,1	14,2	31,3	23,0	12,7	33,8
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. .	101,0	32,4	56,7	50,6	35,7	81,6
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. .	88,6	24,3	48,6	45,7	25,7	64,3

(*) Les témoins de cette expérience sont les mêmes que ceux de l'expérience rapportée au Tableau XXII b.

en tenant compte de l'acidité titrable des milieux (Tableaux XXVI *a*, XXVI *b*, XXVII *a* et XXVII *b*).

Dans cette série d'expériences, le *Sterigmatocystis* AN 315 a formé pour la première fois de l'acide citrique aux dépens du glucose. Ce changement important dans le comportement de la moisissure peut être dû, soit à l'emploi d'eau bidistillée à la place d'eau distillée, soit au fait qu'avant cette expérience la souche AN 315, comme l'AN (H_2) d'ailleurs, a séjourné pendant plusieurs semaines dans un milieu de culture contenant 10 à 15 p. 100 d'acide citrique, ce qui, ainsi que Buchner et Wüstenfeld (34) l'ont signalé, augmente le pouvoir acidifiant des moisissures.

Toutefois, l'AN 315 ne donne toujours qu'un très faible rendement en acide citrique à partir du glucose. Le rendement augmente dans des proportions très considérables (cinq à six fois) grâce à l'addition d'acide pyro- ou orthophosphorique, ces deux acides agissant d'une manière semblable. L'acide chlorhydrique à la dose employée abaisse beaucoup la vitesse de la consommation du sucre, mais augmente le rendement en acide citrique à peu près autant que les acides pyro- et orthophosphoriques. Ces derniers agissent de même lorsqu'ils sont ajoutés au milieu à base de saccharose, mais leur action est bien moins importante que dans le cas du glucose.

Quant à la manière d'agir de l'AN (H_2), on constate qu'il donne pour la première fois des rendements en acide citrique aussi élevés à partir du glucose qu'à partir du saccharose, probablement à cause des deux facteurs nouveaux déjà mentionnés : l'eau bidistillée et le séjour prolongé de la moisissure sur milieu à 15 p. 100 d'acide citrique avant l'ensemencement.

(34) E. BUCHNER et H. WÜSTENFELD, voir p. 18.

TABLEAU XXVIa

Fermentation, par l'AN 315, du glucose et du saccharose en présence d'acide pyrophosphorique ou d'acide orthophosphorique

Durée de la fermentation en jours.	14			16		
Sucre employé .	Glucose			Saccharose		
pH initial . . .	2,6	1,9	1,9	2,6	1,9	1,9
Acide ajouté . .		10 cm ³ H ₄ P ₂ O ₇ M /5	10 cm ³ H ₃ PO ₄ M /5		10 cm ³ H ₄ P ₂ O ₇ M /5	10 cm ³ H ₃ PO ₄ M /5
Aspect du mycélium	noir	blanc	presque blanc	presque blanc	blanc	presque blanc
Poids du mycélium sec en g.	2,8	2,1	2,7	2,5	2,0	2,3
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	8,6	5,3	7,2	10,4	8,9	8,3
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) .	57,3	35,3	48,0	69,3	59,3	55,3
Acide oxalique .	présent	traces	néant	néant	néant	néant
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	0,2	1,0	1,6	1,9	4,3	2,9
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . .	2,7	19,6	21,7	18,5	47,9	34,8
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. .	6,6	22,4	25,5	37,9	74,3	45,3
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. .	2,9	14,3	22,9	27,1	61,4	41,4

TABLEAU XXVI b

Fermentation, par l'AN 315 du glucose et du saccharose, en présence d'acide pyrophosphorique, d'acide orthophosphorique ou d'acide chlorhydrique

Durée de la fermentation en jours. . .	18						21
	glucose			saccharose			
	2,6	1,9	1,9	2,6	1,9	1,9	
Sucre employé		10 cm ³ H ₄ P ₂ O ₇ M /5	10 cm ³ H ₃ PO ₄ M /5		10 cm ³ H ₄ P ₂ O ₇ M /5	10 cm ³ H ₃ PO ₄ M /5	glucose 1,3
pH initial							
Acide ajouté							20 cm ³ HCl M /5
Aspect du mycélium.	noir	blanc	blanc	presque blanc	blanc	presque blanc	blanc
Poids du mycélium sec en g.	2,4	2,3	2,8	2,3	2,1	2,5	0,8
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	8,2	7,1	9,2	10,2	9,6	10,6	3,8
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	54,7	47,3	61,3	68,0	64,0	70,7	25,3
Acide oxalique	présent	présent	néant	néant	néant	néant	néant
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	0,4	1,9	2,4	2,4	4,5	5,4	0,8
Acide citrique p. 100 du sucre consommé	5,4	27,1	26,1	23,6	47,3	51,1	21,9
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N /1	12,9	36,3	38,2	45,5	79,4	82,7	16,2
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N /1	5,7	27,1	34,3	34,3	64,3	77,1	11,4
Fer, dans 1 g. du mycélium sec, en mg.	0,01	0,01	0,01	0	0	0	0,02

TABLEAU XXVII a

*Fermentation, par l'AN (H₂), du glucose et du saccharose
en présence d'acide pyrophosphorique ou d'acide orthophosphorique*

Durée de la fermentation en jours.	15			17		
Sucre employé .	glucose			saccharose		
pH initial . . .	2,6	1,9		2,6	1,9	
Acide ajouté . .		10 cm ³ H ₄ P ₂ O ₇ M /5	10 cm ³ H ₃ PO ₄ M /5		10 cm ³ H ₄ P ₂ O ₇ M /5	10 cm ³ H ₃ PO ₄ M /5
Aspect du mycélium.	presque blanc	blanc	blanc	blanc	blanc	blanc
Poids du mycélium sec en g.	3,4	2,0	2,4	2,7	2,8	2,0
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	14,6	10,3	12,9	12,3	12,6	9,5
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %) .	97,3	68,7	86,0	82,0	84,0	63,3
Acide oxalique .	néant	néant	néant	néant	néant	néant
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	6,8	5,3	6,7	5,0	6,0	3,8
Acide citrique p. 100 du sucre consommé . .	46,8	51,1	52,1	40,5	47,2	39,9
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. .	106,4	86,1	106,0	86,0	99,4	67,7
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1. .	97,1	75,7	95,7	71,4	85,7	54,3
Fer, dans 1 g. du mycélium sec, en mg.	—	0,02	0,01	—	0,005	—

TABLEAU XXVII b
Fermentation, par l'AN (H₂), du glucose et du saccharose
en présence d'acide pyrophosphorique, orthophosphorique ou chlorhydrique

Durée de la fermentation en jours. . .	18						21 glucose
	glucose			sacharose			
	2,6	1,9	10 cm ³ H ₄ P ₂ O ₇ M /5	10 cm ³ H ₃ PO ₄ M /5	2,6	1,9	10 cm ³ H ₃ PO ₄ M /5
Sucre employé							
pH initial							1,3
Acide ajouté							20 cm ³ HCl M /5
Aspect du mycélium.	blanc	blanc	blanc	blanc	blanc	blanc	blanc
Poids du mycélium sec en g.	3,0	1,8	2,6	2,6	3,8	1,9	2,0
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³ . .	13,6	9,5	13,7	12,7	14,0	9,5	8,8
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	90,7	63,3	91,3	84,7	93,3	63,3	58,7
Acide oxalique	néant	néant	néant	néant	néant	néant	néant
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ . . .	4,7	3,7	6,9	6,1	5,2	4,2	1,9
Acide citrique p. 100 du sucre consommé.	34,7	38,9	50,5	47,8	37,1	44,2	21,1
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N /1	73,9	60,6	107,4	99,9	86,9	64,4	29,8
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N /1	67,1	52,9	98,6	87,1	74,3	60,0	27,1
Fer, dans 1 g. du mycélium sec, en mg.	0,015	0,02	0,015	—	—	0	0,01

On note, d'autre part, que les acides pyro-et ortho-phosphoriques favorisent la production de l'acide citrique à partir du glucose et du saccharose, mais d'une manière insignifiante, ce qui s'explique peut-être par le fait que les rendements sont déjà très élevés en l'absence de ces acides (*).

On peut noter, d'autre part, que, contrairement à ce qui se passe avec l'*AN* 315, la présence d'acide chlorhydrique dans le milieu glucosé, non seulement gêne le développement de la moisissure, mais abaisse également le rendement en acide citrique.

En ce qui concerne la teneur en fer du mycélium, on remarque qu'elle est plus élevée lorsque la moisissure s'est développée en présence de glucose que lorsque la fermentation a été conduite sur le milieu renfermant du saccharose. Cette différence est plus accentuée dans le cas de l'*AN* 315 que dans le cas de l'*AN* (H_2).

Au contraire, les quantités de fer fixées ne semblent subir aucune variation importante du fait de l'addition des acides HCl , H_3PO_4 ou $H_4P_2O_7$.

En vue de compléter nos tentatives de fixation de certains métaux lourds, nous avons songé ensuite à essayer d'éliminer le fer par l' α - α' -dipyridyl, signalé par R. Hill (60) comme capable de donner un composé très stable avec l'ion Fe^{++} . Les résultats de cette expé-

(*) En effet, si l'on calcule les rendements possibles en acide citrique aux dépens du saccharose d'après le schéma admis ici-même (voir p. 7), on voit que 100 g. de saccharose sont susceptibles de fournir au maximum 81,9 g. d'acide citrique cristallisé. A ce chiffre théorique on peut opposer le rendement optimum obtenu au cours de nos essais, qui s'élève à 56 p. 100 environ (voir Tableau XXV b, p. 83).

Cependant, pour pouvoir comparer le rendement théorique au chiffre expérimental, il faudrait rapporter ce dernier non pas à la totalité du sucre consommé, mais uniquement à la fraction du sucre consommé qui n'a pas été utilisée à l'édification du mycélium.

(60) R. HILL, A method for the estimation of iron in biological material. *Proc. roy. Soc. Lond.*, 1931 (B), **107**, 205-214.

rience effectuée avec l'AN 315 (Tableau XXVIII), nous montrent que ce composé augmente le rendement en acide citrique à partir du glucose, mais le diminue dans le cas du saccharose.

TABLEAU XXVIII

Fermentation, par l'AN 315, du glucose et du saccharose en présence d' α - α' -dipyridyl

Durée de la fermentation en jours	14		16	
	glucose		saccharose	
Sucre employé				
α - α' -dipyridyl	0 (*)	présent	0 (*)	présent
Aspect du mycélium. .	noir	noir	blanc	noir
Poids du mycélium sec en g.	2,8	2,8	2,5	2,4
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³	8,6	9,4	10,4	9,0
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	57,3	62,7	69,3	60,6
Acide oxalique	présent	néant	néant	néant
Acide citrique en g. dans 100 cm ³	0,2	0,5	1,9	1,0
Acide citrique p. 100 du sucre consommé. . .	2,7	4,8	18,5	10,8
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1 .	6,6	10,9	37,9	19,1
Acide citrique exprimé en cm ³ NaOH N/1 .	2,9	7,1	27,1	14,3

Voici les conclusions que l'on peut formuler à la suite des expériences qui viennent d'être rapportées.

(*) Les témoins de cette expérience sont les mêmes que ceux de l'expérience rapportée au Tableau XXVIa.

Les deux *Sterigmatocystis* employés sont très différents en leur qualité de « ferments citriques ».

L'emploi d'eau bidistillée d'une part, et d'autre part le séjour prolongé de ces ferments citriques dans un milieu à 10 ou 15 p. 100 d'acide citrique avant l'ensemencement, exaltent leur pouvoir fermentatif. Dans ces conditions, même l'*AN 315* se montre capable de produire de l'acide citrique à partir du glucose, en quantité peu élevée, il est vrai. En outre, les acides pyro- et orthophosphoriques augmentent notablement le rendement en acide citrique, à condition qu'il ne soit déjà très élevé même en l'absence de ces acides.

L'acide chlorhydrique, à la concentration employée, gêne le développement du mycélium ; il favorise cependant la production de l'acide citrique dans le cas où l'*AN 315* agit en milieu glucosé. Enfin, l' α - α' -dipyridyl, que l'on a fait agir sur l'*AN 315*, augmente le rendement en acide citrique à partir du glucose, mais le diminue dans le cas du saccharose.

CHAPITRE IV

Influence du fer sur la marche de la fermentation citrique

Dans ce qui précède, il a été rendu compte d'expériences effectuées en vue d'agir sur la fermentation citrique par l'élimination, à l'aide de divers réactifs, des métaux lourds éventuellement présents dans le milieu de culture. Parmi les réactifs utilisés seuls les acides pyrophosphorique et orthophosphorique se sont montrés efficaces.

En présence de ces faits, nous nous sommes demandé si, inversement, l'addition de fer, par exemple, ne se traduirait pas par un affaiblissement de la fermentation citrique. C'est ainsi que nous avons été conduits à étudier l'effet de différentes doses de fer bivalent et de fer trivalent. Les expériences effectuées à ce sujet ont porté sur l'*AN* (H_2). Le fer bivalent a été ajouté sous la forme de sel de Mohr ; le fer trivalent sous la forme d'alun de fer ammoniacal. Voici les résultats obtenus (Tableaux XXIX *a*, XXIX *b*, XXX *a* et XXX *b*).

Il résulte tout d'abord des données expérimentales résumées dans ces tableaux que l'action du fer trivalent est tout à fait différente de celle qu'exerce le fer bivalent. Ainsi, dans le premier cas, des doses de F^{+++} allant de 4 à 16 mg. par 100 cm³ n'influent pratiquement pas sur la consommation du sucre, ni sur la formation de l'acide citrique. Le seul effet que ce cation provoque, c'est l'apparition d'acide oxalique. Lorsque le fer trivalent est ajouté au milieu renfermant

TABLEAU XXIX a
Fermentation, par l'AN (H₂), du saccharose en présence de fer trivalent ou bivalent

Durée de la fermentation en jours . . .	19						
	0	4	8	16	0	0	8
Fe+ + + ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . .	0	0	0	0	8	16	0
Fe+ + ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . .	0	0	0	0	0	0	10
H ₄ P ₂ O ₇ ajouté, en cm ³ M /5	blanc	blanc	blanc	blanc	noir	blanc, taches rouges	blanc
Aspect du mycélium.	2,4	2,2	2,6	2,6	2,5	0,9	2,4
Poids du mycélium sec en g.	10,4	9,2	11,0	12,0	11,5	3,3	10,4
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³ . .	69,3	61,3	73,3	80,0	76,7	22,0	69,3
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	4,4	3,1	3,7	4,0	2,2	néant	3,3
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ . .	42,7	34,0	33,5	33,3	19,4	0	32,2
Acide citrique p. 100 du sucre consommé.	néant	0,2	0,2	0,2	0,4	néant	0,1
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³ . .	0	5,2	5,4	5,8	20,2	—	4,6
Acide oxalique p. 100 de l'acide citrique.	69,8	52,0	61,2	68,9	42,4	4,3	55,4
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N /1	63,1	47,3	55,8	60,6	38,9	0	50,3
Acides oxalique et citrique exprimés en cm ³ NaOH N /1.							

TABLEAU XXIX b
Fermentation, par l'AN (H₂), du saccharose en présence de fer trivalent ou bivalent

Durée de la fermentation en jours . . .	26						
	0	4	8	16	0	0	8
Fe++ + ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . . .	0	0	0	0	8	16	0
Fe++ + ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . . .	0	0	0	0	0	0	10
H ₄ P ₂ O ₇ ajouté, en cm ³ M/5.	presque blanc	blanc	blanc	blanc	noir	presque noir, taches rouges	blanc
Aspect du mycélium.	3,4	2,9	2,1	2,2	2,5	2,4	2,4
Poids du mycélium sec en g.	14,6	12,6	10,0	10,7	13,4	9,7	12,2
Sucres consommés en g. dans 100 cm ³ . . .	97,3	84,0	66,7	71,3	89,3	64,7	81,3
Sucres consommés p. 100 du sucre total (15 %).	5,1	4,9	3,4	3,4	2,7	0,4	5,2
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ . . .	35,1	38,9	34,0	32,1	19,8	3,7	42,4
Acide citrique p. 100 du sucre consommé	néant	0,2	0,2	—	0,3	0,1	0,3
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³ . . .	0	4,4	5,6	—	10,7	24,5	5,8
Acide oxalique p. 100 de l'acide citrique	85,7	78,7	56,2	57,7	49,7	11,9	84,1
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1.	73,4	73,4	51,6	—	42,5	6,7	78,8
Acides oxalique et citrique exprimés en cm ³ NaOH N/1.							

TABLEAU XXX a

*Fermentation, par l'AN (H₂), du saccharose
en présence de fer trivalent ou bivalent*

Durée de la fermentation en jours. . .	18				
Fe+++ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ .	0	8	16	0	0
Fe++ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . . .	0	0	0	8	16
Aspect du mycélium.	blanc	blanc	blanc	noir, taches rouges	presque noir
Poids du mycélium sec en g. . . .	2,7	2,7	3,1	2,1	2,6
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³ .	10,8	11,6	12,9	9,2	10,2
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	72,0	77,3	86,0	61,3	68,0
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ . . .	4,5	4,8	5,5	1,6	0,7
Acide citrique p. 100 du sucre consommé	41,6	41,5	42,8	17,4	6,6
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³ . . .	traces (0,04)	0,1	0,2	0,2	0,1
Acide oxalique p. 100 de l'acide citrique.	0,9	2,7	3,5	15,1	11,6
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N /1.	71,8	79,9	93,2	32,0	17,2
Acides citrique et oxalique exprimés en cm ³ NaOH N /1	62,0	70,8	82,0	26,7	11,0

TABLEAU XXX b

Fermentation, par l'AN (H₂), du saccharose, en présence de fer trivalent ou bivalent

Durée de la fermentation en jours. .	21				
Fe+++ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ .	0	8	16	0	0
Fe++ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . . .	0	0	0	8	16
Aspect du mycélium.	blanc	blanc	blanc, taches rouges	noir, taches rouges	presque blanc, taches rouges
Poids du mycélium sec en g.	3,2	3,0	2,9	2,6	2,5
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³ .	13,0	12,2	12,8	12,4	10,1
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	86,7	81,3	85,3	82,7	67,3
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ . . .	5,3	5,3	5,7	3,6	0,4
Acide citrique p. 100 du sucre consommé	40,4	43,0	44,8	28,8	4,3
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³ . . .	néant	0,2	0,2	0,2	néant
Acide oxalique p. 100 de l'acide citrique.	0	3,0	3,6	4,6	0
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N /1.	82,9	87,2	95,4	59,5	10,4
Acides citrique et oxalique exprimés en cm ³ NaOH N /1.	75,0	77,6	85,2	53,6	6,1

de l'acide pyrophosphorique, les résultats sont encore les mêmes. Les quantités d'acide oxalique formées ne dépassent pas 6 p. 100 de l'acide citrique.

L'addition du fer trivalent est également sans influence sur l'aspect du mycélium, qui reste friable, peu compact et blanc aussi longtemps que celui des

TABLEAU XXXIa

Résumé des résultats relatifs à la production d'acide oxalique par l'AN (H₂) en présence de Fe+++ et de Fe++

Durée de la fermentation en jours. . .	19				
Fe+++ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ .	4	8	16	0	8
Fe++ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . . .	0	0	0	8	0
H ₄ P ₂ O ₇ ajouté, en cm ³ M /5.	0	0	0	0	10
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³ . . .	0,16	0,20	0,23	0,44	0,15
Acide oxalique exprimé en cm ³ NaOH N /1.	2,6	3,2	3,6	7,0	2,4
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N /1	52,0	61,2	68,9	42,4	55,4
Acide oxalique p. 100 de l'acidité titrable totale	5,0	5,2	5,2	16,5	4,3

cultures témoins. Ce mycélium présente toutefois souvent des taches rougeâtres sur les deux faces. L'analyse chimique nous a montré que ces taches renferment des quantités élevées de fer et qu'il s'agit simplement de dépôts d'oxydes de fer qu'on peut mettre en évidence sous le microscope, à l'aide de réactifs appropriés.

Le fer bivalent, au contraire, modifie de manière très importante la marche de la fermentation. Ainsi, à la dose de 8 mg. par 100 cm³, le fer bivalent, tout en modifiant à peine la vitesse de la consommation du sucre, réduit fortement le rendement en acide citrique et provoque la formation de quantités d'acide

TABLEAU XXXI b

Résumé des résultats relatifs à la production d'acide oxalique par l'AN (H₂) en présence de Fe+++ et de Fe++

Durée de la fermentation en jours. . .	26				
Fe+++ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ .	4	8	0	0	8
Fe++ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . . .	0	0	8	16	0
H ₄ P ₂ O ₇ ajouté, en cm ³ M/5.	0	0	0	0	10
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³ . . .	0,22	0,19	0,29	0,10	0,30
Acide oxalique exprimé en cm ³ NaOH N/1.	3,4	3,0	4,6	1,6	4,8
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1.	78,7	56,2	49,7	11,9	84,1
Acide oxalique p. 100 de l'acidité titrable totale	4,3	5,3	9,3	13,5	5,7

oxalique pouvant dépasser 20 p. 100 de l'acide citrique. Dans ces conditions, le mycélium devient compact et noircit rapidement. Dans ce cas encore, on observe fréquemment la formation de taches rougeâtres dans les mycéliums.

Lorsque le fer bivalent est ajouté à la dose de 16 mg. par 100 cm³, on observe une influence nettement

inhibitrice ; la consommation du sucre est elle-même très ralentie, et il ne se forme que très peu ou pas du tout d'acide citrique et d'acide oxalique. Dans ce cas le mycélium est peu compact et noircit lentement.

Ces expériences font ressortir le fait que le fer bivalent et le fer trivalent, tout en agissant de manière

TABLEAU XXXII

Résumé des résultats relatifs à la production d'acide oxalique par l'AN' (H₂) en présence de Fe+++ et de Fe++

Durée de la fermentation en jours. .	18			21			
Fe+++ ajouté en g. dans 100 cm ³ . . .	8	16	0	0	8	16	0
Fe++ ajouté en g. dans 100 cm ³ . . .	0	0	8	16	0	0	8
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³ . . .	0,13	0,19	0,24	0,08	0,16	0,20	0,17
Acide oxalique exprimé en cm ³ NaOH N/1. . .	2,1	3,0	3,8	1,3	2,6	3,2	2,6
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	79,9	93,2	32,0	17,2	87,2	95,4	59,5
Acide oxalique p. 100 de l'acidité titrable totale.	2,6	3,2	11,9	7,6	3,0	3,4	4,4

différente sur la fermentation citrique, provoquent l'un et l'autre la formation d'acide oxalique, dont la quantité peut atteindre 17 p. 100 de l'acidité titrable totale, ainsi que le montrent les Tableaux XXXI *a*, XXXI *b* et XXXII. Les chiffres consignés dans ces Tableaux sont extraits des Tableaux XXIX *a*, XXIX *b*, XXX *a* et XXX *b*, qui résument les expériences principales.

Il y a lieu de rappeler à ce propos que le *Sterigmato-*

cystis AN 315 produit aussi de l'acide oxalique, lorsqu'on le fait agir soit sur du glucose, soit sur du fructose, soit sur un mélange de ces deux sucres, la quantité d'acide oxalique formé pouvant atteindre 64 p. 100 de l'acidité titrable totale. Ces résultats sont résumés dans le Tableau XXXIII.

TABLEAU XXXIII

Résumé des résultats relatifs à la production d'acide oxalique par l'AN 315 (*)

Durée de la fermentation en jours.	10			18		
	glucose	fructose	fructose + glucose	glucose	fructose	fructose + glucose
Sucre employé .						
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³	0,131	0,125	0,177	0,205	0,315	0,277
Acide oxalique exprimé en cm ³ NaOH N/1. . .	2,1	2,0	2,8	3,3	5,0	4,4
Acidité titrable totale en cm ³ NaOH N/1. . .	3,9	3,6	5,4	5,4	7,8	8,1
Acide oxalique p. 100 de l'acidité titrable totale	53,8	55,6	51,9	61,1	64,0	54,3

Les expériences effectuées jusqu'ici avec le fer (**) ont été conduites à pH 2,4. Nous avons tenu à examiner dans quel sens agirait ce métal dans des milieux renfermant de la craie (pH 7 environ). Les Tableaux

(*) Les chiffres ci-dessous ont été déjà rapportés dans les Tableaux VIII b et VIIIc, p. 45 et 46.

(**) Malheureusement, les expériences effectuées avec l'AN 315 en présence de fer bivalent et trivalent ont été troublées par des accidents, de sorte que nous avons dû renoncer à les exposer.

XXXIV *a* et XXXIV *b* rendent compte des essais effectués à ce sujet avec l'AN (H_2).

TABLEAU XXXIV *a*

Fermentation, par l'AN (H_2), du saccharose en présence de fer trivalent ou bivalent, et de craie

Durée de la fermentation en jours. . .	19				
Fe ⁺⁺⁺ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . . .	0	8	16	0	0
Fe ⁺⁺ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . . .	0	0	0	8	16
Aspect du mycélium.	noir, compact	presque blanc, compact	noir, taches rouges, compact	noir, compact	presque blanc, compact
Poids du mycélium sec en g.	2,4	2,9	2,3	3,3	—
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³ .	10,6	11,9	10,2	11,9	5,2
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	70,7	79,3	68,0	79,3	34,7
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ . . .	0,9	0,8	0,6	1,3	0,5
Acide citrique p. 100 du sucre consommé	8,8	6,7	6,3	11,2	9,8
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³ . . .	présent	néant	présent	traces	néant
Acide oxalique p. 100 de l'acide citrique.	—	0	—	négligeable	0
Acides citrique et oxalique exprimés en cm ³ NaOH N/1	—	11,4	—	19,1	7,3

Ces résultats montrent qu'à une réaction maintenue constante à pH 7 environ, la moisissure consomme à peu près autant de sucre et produit à

peu près autant d'acide citrique en présence qu'en l'absence de fer bivalent ou trivalent. Les rendements

TABLEAU XXXIV b

Fermentation, par l'AN (H₂), du saccharose en présence de fer trivalent ou bivalent, et de craie

Durée de la fermentation en jours. . .	23				
Fe ⁺⁺⁺ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ .	0	8	16	0	0
Fe ⁺⁺ ajouté, en mg. dans 100 cm ³ . . .	0	0	0	8	16
Aspect du mycélium.	presque blanc, compact, taches vertes	noir, compact, taches rouges	presque blanc, compact, taches vertes	noir, compact	presque blanc, compact, taches vertes
Poids du mycélium sec en g.	3,4	2,4	3,0	3,3	3,0
Sucre consommé en g. dans 100 cm ³ .	13,4	11,0	11,9	10,5	12,0
Sucre consommé p. 100 du sucre total (15 %).	89,3	73,3	79,3	70,0	80,0
Acide citrique en g. dans 100 cm ³ . . .	0,7	0,8	0,7	1,1	0,7
Acide citrique p. 100 du sucre consommé	5,2	7,2	5,8	10,3	5,7
Acide oxalique en g. dans 100 cm ³ . . .	néant	0,1	néant	0,2	néant
Acide oxalique p. 100 de l'acide citrique.	0	9,8	0	13,6	0
Acides citrique et oxalique exprimés en cm ³ NaOH N/1	10,0	12,5	9,9	17,8	9,7

en acide citrique sont toutefois très faibles. D'autre part, il y a lieu de noter que la présence de 16 mg. de fer bivalent ralentit notablement la consommation

du sucre. La formation d'acide oxalique s'observe irrégulièrement. Le mycélium est toujours très compact, et, dans les milieux additionnés de fer, souvent taché de rouge.

Le changement de la réaction du milieu, de pH 2,4 à pH 7 environ, a donc pour résultat d'abolir l'influence du fer, telle qu'elle se manifeste dans les milieux acides.

Faut-il envisager ici la possibilité de formation de composés ferrugineux, dont la stabilité serait fonction de la concentration du milieu en ions hydrogène ? C'est un problème qui mérite d'être étudié spécialement, surtout en rapport avec les faits signalés par C. V. Smythe et C. L. Schmidt (61) et sur lesquels L. Genevois (62) vient attirer l'attention.

Notons encore que les études de l'influence des métaux lourds sur la fermentation citrique ont donné lieu à des résultats souvent contradictoires.

Nos résultats sont, dans leur ensemble, en accord avec ceux de M. Molliard (31). Cependant, des auteurs italiens (63) ont signalé que, pour certaines souches d'*Aspergillus niger*, le fer trivalent peut se montrer favorable à la production de l'acide citrique, alors que pour d'autres souches la présence de ce cation empêche presque complètement la formation de l'acide citrique.

(61) C. V. SMYTHE et C. L. SCHMIDT, Studies on the mode of combination of iron with certain proteins, aminoacids and related compounds. *Journ. of biol. Chem.*, 1930, **88**, 241-269.

C. V. SMYTHE, The titration of hydroxy-organic acids in the presence of ferric and cupric salts. *Journ. of biol. Chem.*, 1931, **92**, 233-244.

(62) L. GENEVOIS, Recherches récentes sur les complexes du fer, application à l'étude des vins. *Ann. Brass. Dist.*, 1933, **31**, 188-192 et 205-208.

(63) A. QUILICO et A. DI CAPUA, Sopra l'influenza del ferro sulla fermentazione citrica dell'*Aspergillus niger*. *Giorn. Chim. Ind. Appl.*, 1932, **14**, 289-293.

Voir aussi :

V. BOLCATO, Azioni tampone sull'attività di un *Aspergillo*. Contenuto tampone, ferro e azoto del mezzo. *Giorn. Chim. Ind. Appl.*, 1934, **16**, 552-555.

CHAPITRE V

Résumé général

Nos premières recherches, qui ont porté sur une souche de *Sterigmatocystis nigra* cataloguée sous la désignation *AN 315*, font voir que cette moisissure produit de l'acide citrique dans un milieu contenant du saccharose, mais se montre incapable d'en former à partir du glucose, toutes conditions égales d'ailleurs.

Bien que ce *Sterigmatocystis nigra* hydrolyse, comme toutes les souches connues de cette moisissure, le saccharose, la souche employée par nous n'a produit d'acide citrique, ni aux dépens de fructose, ni aux dépens d'un mélange équimoléculaire de fructose et de glucose.

La différence dans le comportement de la moisissure, suivant qu'elle se trouve en présence de glucose ou bien de saccharose, nous a conduits à rechercher si le premier de ces sucres n'exerçait pas une influence inhibitrice sur la production d'acide citrique par les impuretés qu'il pourrait renfermer, des traces de métaux lourds notamment.

Nous avons donc tout d'abord purifié le glucose à l'aide de « Norit », mais cette purification n'a entraîné aucun changement dans le comportement de la moisissure.

Devant cet échec, nous avons essayé d'éliminer les métaux lourds du milieu de culture, à l'aide de certains composés chimiques capables de les entraîner dans des complexes insolubles. Le sulfocyanure d'ammonium, employé en premier lieu, non seulement ne rend pas le glucose apte à la fermentation citrique,

mais empêche notre souche de *Sterigmatocystis* de former l'acide citrique, même à partir du saccharose. Pourtant, en présence de ce composé, la moisissure forme un mycélium peu compact et qui reste longtemps sans fructifier, traits qui caractérisent en général les bons producteurs d'acide citrique.

Le cyanate et le cyanure de potassium n'ont pas conduit à des résultats meilleurs. Le premier de ces sels provoque une diminution du rendement en acide citrique à partir du saccharose. Le second exerce un effet retardateur très net sur la vitesse de la fermentation citrique dès son début, mais cet effet inhibiteur disparaît ensuite sans que soit modifiée sensiblement la capacité de la moisissure à produire de l'acide citrique.

Nous avons étudié ensuite l'influence du KCN sur la marche de la fermentation dans des milieux renfermant du glucose. La production de l'acide citrique dans ce cas a été nulle, même lorsque nous avons pris soin d'ajouter une nouvelle dose de KCN quelques jours après la première, et ceci afin de compenser l'affaiblissement progressif de l'action de ce sel.

Ces fermentations ont eu lieu en milieu acide (pH 2,6 environ). Lorsqu'on conduit la fermentation en milieu maintenu neutre par l'addition de craie, la moisissure produit de l'acide citrique à partir du glucose, mais ce rendement est faible par rapport à ce que fournit le saccharose. L'addition de KCN ne modifie en rien la formation de cet acide.

Des résultats bien meilleurs ont été obtenus dans les expériences au cours desquelles on a essayé de fixer les métaux lourds par l'addition d'acide pyrophosphorique. En présence de cet acide, la souche AN 315 a formé de l'acide citrique à partir du glucose avec un rendement comparable à celui que four-

nissent les cultures faites en présence de saccharose.

Il nous a paru intéressant de voir si on pouvait étendre les résultats qui viennent d'être relatés à une autre souche de *Sterigmatocystis nigra*, cataloguée sous la désignation *AN* (H_2).

Une première série d'essais a été consacrée à l'étude de cette nouvelle souche comparativement avec la précédente. Il résulte de ces essais que l'*AN* (H_2) dégrade le saccharose plus rapidement que l'*AN* 315 et fournit, en outre, un bien meilleur rendement en acide citrique. D'autre part, la nouvelle souche étudiée, à l'opposé de l'*AN* 315, est capable de produire de l'acide citrique à partir du glucose, bien que le rendement soit inférieur à celui que l'on obtient dans le cas du saccharose.

Les propriétés biochimiques de nos deux souches d'*Aspergillacées* étant ainsi établies, nous avons procédé à une étude de l'effet que produit l'acide pyrophosphorique sur la fermentation du glucose par la nouvelle souche de *Sterigmatocystis*. Il résulte de nos essais qu'en présence de ce composé, les rendements en acide citrique sont considérablement augmentés.

Nous avons étudié ensuite l'effet de l'addition de l'acide orthophosphorique et de l'acide chlorhydrique. On pouvait se demander, en effet, si l'action favorable de l'acide pyrophosphorique n'était pas imputable tout simplement à l'acidification du milieu qu'entraîne son addition. D'autre part, l'acide pyrophosphorique aurait pu être graduellement transformé en acide orthophosphorique.

Ces expériences ont fait voir que, en effet, l'acide orthophosphorique employé en quantité équivalente se comporte sensiblement comme l'acide pyrophosphorique. L'acide chlorhydrique, au contraire, à la dose étudiée, semble exercer plutôt un effet inhibiteur sur le développement de la moisissure.

Dans cette dernière série d'essais et dans les suivantes, on a fait usage exclusivement d'eau bidistillée, et les cultures ont été mises en fermentation à l'aide de conidies issues de cultures antérieures maintenues en milieu fortement acide (10 et 15 p. 100 d'acide citrique) pendant plusieurs semaines. Grâce à ces deux facteurs nouveaux, la souche *AN* 315 s'est montrée, elle aussi, capable de former de l'acide citrique aux dépens du glucose. Mais le rendement obtenu est bien faible, et, fait important, il augmente cinq à six fois, lorsqu'on conduit la fermentation en présence d'acide pyro- ou orthophosphorique. En présence d'acide chlorhydrique, le rendement en acide citrique est tout aussi élevé, mais on constate que le développement du mycélium est faible.

Dans le cas de l'*AN* (H_2), au contraire, la présence des acides pyro- et orthophosphorique n'entraîne qu'une augmentation insignifiante du rendement par rapport aux essais témoins. Les rendements de ces essais, en effet, sont très élevés et l'on peut admettre qu'il n'y a guère place pour une augmentation.

Dans les expériences qui suivirent nous avons étudié l'influence sur la fermentation citrique de l'addition de fer au milieu de culture. Nous avons étudié ainsi l'effet du fer bivalent et du fer trivalent à des doses variables. Ces expériences ont porté sur l'*AN* (H_2).

Il résulte de ces essais que seule l'addition de fer bivalent diminue fortement le rendement en acide citrique, alors que l'addition de fer trivalent n'entraîne aucune modification de ce rendement. Toutefois, le Fe^{++} et le Fe^{+++} , tout en agissant de manière différente sur la formation de l'acide citrique, provoquent l'un et l'autre la formation d'acide oxalique, dont la quantité peut atteindre 17 p. 100 de l'acidité totale formée.

Les résultats qui viennent d'être exposés ont été

obtenus à pH 2,4 environ. Il y avait lieu d'examiner dans quel sens agirait le fer dans le milieu maintenu neutre grâce à l'addition de craie. Il ressort des essais effectués à ce sujet qu'à pH 7 environ, l'*AN* (H_2) fournit en présence de fer bivalent ou trivalent, ou en l'absence de ce métal, des rendements en acide citrique qui sont du même ordre. Ces rendements, cependant, restent très faibles et il faut noter également que l'acide oxalique ne se forme qu'irrégulièrement.

Dans ce résumé général, seuls les faits expérimentaux ont été mentionnés. Les considérations d'ordre théorique que ces faits suggèrent sont discutées longuement dans l'exposé même de notre travail.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

LA VIE SANS OXYGÈNE

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 24 Novembre 1936.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Ch. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris :
S. CHARLÉTY.

IMPRIMERIE ALENÇONNAISE
9-13, rue des Marcheries
-- -- ALENÇON -- ~

